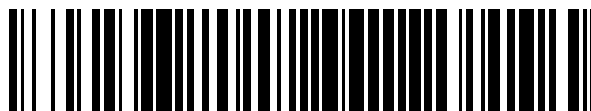


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 897**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2011 E 13196980 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.10.2014 EP 2711422**

54 Título: **Inhibidores de varios microARN para usar en la prevención y/o atenuación del envejecimiento cutáneo y/o para hidratar la piel**

30 Prioridad:

09.06.2010 US 797270
09.06.2010 EP 10305617

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.01.2015

73 Titular/es:

CHANEL PARFUMS BEAUTÉ (100.0%)
135 avenue Charles de Gaulle
92200 Neuilly-sur-Seine, FR

72 Inventor/es:

CANDI, ELEONORA;
MELINO, GENNARO;
SAINTIGNY, GAËLLE y
MAHE, CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 526 897 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Inhibidores de varios microARN para usar en la prevención y/o atenuación del envejecimiento cutáneo y/o para hidratar la piel

5 La invención se refiere a la identificación y el uso de compuestos que inhiben la expresión o la actividad de varios microARN para la prevención y/o atenuación del envejecimiento cutáneo, y/o para la hidratación de la piel.

10 La senescencia celular es una forma de parada irreversible del crecimiento, descrita originalmente para las células en cultivo que se encuentran en la etapa final de la proliferación, pero que se sabe que se estimulan con distintos estímulos, tales como lesiones del ADN, estrés oxidativo, quimioterapia y exceso de los estímulos mitóticos, tales como la activación oncogénica (Serrano et al., 1997; Campisi 2001; Schmitt et al., 2002). Las células entran en una
15 etapa de parada irreversible y muestran rasgos distintivos, que incluyen la estimulación de la actividad de la β -galactosidasa y el incremento de la expresión de mediadores clave, entre ellos la p53, la proteína de la leucemia promielocítica (PML, por su nombre en inglés), la p16INK4a y la p19Arf (Serrano et al., 1997, Narita et al., 2003; Sharpless et al., 2004). Aunque se ha estudiado principalmente *in vitro*, la senescencia celular mantiene una relación correlativa con el proceso del envejecimiento del animal en su conjunto, con lo que intervienen muchos de los
20 factores que regulan la senescencia y que contribuyen al envejecimiento del organismo (Sharpless y DePinho, 2004, Campisi, 2005).

25 Los últimos hallazgos han establecido que la proteína p63, relacionada con la p53, es una molécula clave a la hora de conectar la senescencia y el envejecimiento (Keyers et al., 2005; Sommer et al., 2006). De hecho, los ratones heterocigotos para p63 tienen una esperanza de vida más pequeña y muestran rasgos de envejecimiento acelerado. Las células que carecen de p63, tanto somáticas como reproductoras, tienen estimulada la expresión de la actividad de la β -galactosidasa, de PML y de p16INK4a, lo que demuestra que la falta de p63 aceleró el fenotipo de envejecimiento (Keyers et al., 2005). Además de su intervención en el envejecimiento, el factor de transcripción p63 desempeña una función importante en el desarrollo debido a su capacidad para regular la proliferación epitelial, la diferenciación y el destino celular. Los ratones con la p63 genosuprimida muestran varios defectos epiteliales, entre
30 ellos, ausencia de piel, cabello y derivados ectodérmicos (Yang et al., 1999; Mills et al., 1999). Algunos informes indican que p63 es esencial para mantener la reserva de células madre de la epidermis (Seeno et al., 2007). Recientemente se ha descrito que p63 está también regulada por varios microARN. En particular, se ha demostrado que miR-203, al actuar selectivamente sobre p63, controla el potencial proliferativo de los queratinocitos de la membrana basal (Lena et al., 2008; Yi et al., 2008), con lo que controla la transición crucial entre la membrana basal y la espinosa.

Sirt-1 (o Sirt-1) es también una molécula clave que conecta la senescencia y el envejecimiento. Se trata de una desacetilasa dependiente de NAD⁺ que regula la expresión génica mediante la desacetilación de los restos lisina de las histonas, factores de transcripción y cofactores. Las células con mayor cantidad de Sirt-1 mejoran la eficacia metabólica, lo que favorece la longevidad y la resistencia a enfermedades (Haigis M. C., Guarente L. P.
35 «Mammalian sirtuins-emerging roles in physiology, aging and calorie restriction». *Genes Dev.* 2006. 1; 20 (21): 2913-21). Además, se sabe que Sirt-1 es capaz de proteger frente a la disfunción endotelial al impedir la senescencia inducida por estrés (Potente M, Ghaeni L, Baldessari D, Mostoslavsky R, Rossig L, Dequiedt F, Haendeler J, Mione M, Dejana E, Alt F. W., Zeiher A. M., Dimmeler S. «SIRT1 controls endothelial angiogenic functions during vascular growth». *Genes Dev.* 2007. 21(20): 2644-58). Se ha demostrado recientemente que Sirt-1 está regulada por el
40 microARN miR-217 en el sistema de senescencia con las células endoteliales (Menghini R, Casagrande V, Cardellini M, Marteli E, Terrinoni A, Amati F, Vasa-Nicotera M, Ippoliti A, Novelli G, Melino G, Lauro R, Federici M. «MicroRNA 217 modulates endothelial cell senescence via silent information regulator 1». *Circulation* 2009. 120 (15): 1524-32).

Se identificó que CDK6 era un nuevo miembro de una familia de cinasas relacionadas con la cdc-2 de los vertebrados. Esta nueva cinasa se encontró que era la pareja de las ciclinas de tipo D y que poseía actividad cinasa sobre pRb *in vitro*, y desde entonces se ha sabido que funciona únicamente como una cinasa de pRb (retinoblastoma) en la regulación de la fase G(1) del ciclo celular. En los últimos dos años, varios estudios independientes en varios tipos celulares han indicado que cdk6 tiene una nueva función en la diferenciación. No se conoce el mecanismo por el que cdk6 interviene en la diferenciación, pero puede extenderse más allá de la función establecida de que cdk6 es una cinasa de pRb. A medida que esta historia avance, será importante descubrir si la
50 función de cdk6 en la diferenciación es dependiente de pRb o es independiente de pRb, ya que se ha establecido hace tiempo que pRb es un factor clave para el inicio y el mantenimiento de la salida del ciclo celular durante la diferenciación (Kohrt D. M. et al., *Cycle.* 2009, 1; 8 (17): 2837-43; Grossel M. J., et al., *J. Cell Biochem.* 2006; 97 (3): 485-93). Nunca antes se había descrito que cdk6 estuviera implicada en la senescencia.

60 Los microARN (miR) son moléculas de ARN monocatenario que regulan la expresión del ARNm mensajero. Los miR se sintetizan como transcritos de pre-microARN que se transportan al citoplasma, donde sufren la escisión por Dicer, una enzima de tipo ribonucleasa III. En los mamíferos, Dicer desempeña funciones importantes en la diferenciación celular y en la morfogenia del tejido, y la desaparición de Dicer en los ratones induce mortalidad embrionaria en la etapa del desarrollo E6-E7 (Bernstein et al., 2003). La eliminación de Dicer en los fibroblastos embrionarios induce un fenotipo de senescencia prematura que también se ha observado *in vivo* después de la eliminación de Dicer de las extremidades en desarrollo y de la piel adulta (Mudhasani et al., 2008). Los miR maduros regulan negativamente

la expresión génica al actuar selectivamente sobre ARNm mensajeros específicos para escindirlos o para reprimir su traducción. Cada vez hay más datos que sugieren que están implicados en el control de un amplio abanico de vías fisiológicas, entre ellas la senescencia celular.

Así pues, es deseable e importante dar a conocer productos o agentes activos que previenen, reducen o incluso inhiben la senescencia celular, en particular la senescencia de los queratinocitos.

Así pues, la presente invención da a conocer un procedimiento para identificar tales agentes útiles.

La presente invención está relacionada, por lo tanto, con un procedimiento *in vitro* de cribado de compuestos candidatos por su capacidad para prevenir y/o atenuar el envejecimiento de la piel, y/o para hidratar la piel, que comprende las etapas siguientes:

- 10 a. poner en contacto al menos un compuesto problema con una muestra de queratinocitos;
- b. medir la expresión o la actividad de al menos un microARN en dichos queratinocitos;
- c. seleccionar los compuestos en los que se mide una inhibición de la expresión de al menos el 20%, preferiblemente de al menos el 30%, preferiblemente de al menos el 40%, o una inhibición de la actividad de al menos el 20%, preferiblemente de al menos el 30%, preferiblemente de al menos el 40%, de al menos un microARN
- 15 en los queratinocitos tratados en (a) en comparación con los queratinocitos sin tratar.

Preferiblemente, los queratinocitos son queratinocitos presenescentes. Así pues, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para la detección de compuestos candidatos capaces de prevenir y/o atenuar el envejecimiento de la piel, y/o para hidratar la piel, que comprende las etapas siguientes:

- a. poner en contacto al menos un compuesto problema con una muestra de queratinocitos presenescentes;
- 20 b. medir la expresión o la actividad de al menos un microARN en dichos queratinocitos presenescentes;
- c. seleccionar los compuestos en los que se mide una inhibición de la expresión de al menos el 20%, preferiblemente de al menos el 30%, preferiblemente de al menos el 40%, o una inhibición de la actividad de al menos el 20%, preferiblemente de al menos el 30%, preferiblemente de al menos el 40%, de al menos un microARN
- 25 en los queratinocitos presenescentes tratados en (a) en comparación con los queratinocitos presenescentes sin tratar.

Con «queratinocitos presenescentes» se hace referencia a las células que expresan la p16 en cantidad detectable (una cantidad que se puede determinar mediante una inmunotransferencia de tipo Western), pero que no expresan la β -galactosidasa; son β -gal⁻. Estas células proliferan más lentamente que los queratinocitos jóvenes.

- 30 De acuerdo con una primera realización, la etapa (b) se realiza antes y después de la etapa (a). En este caso, la expresión o la actividad del microARN medido en los queratinocitos, preferiblemente presenescentes, antes de la etapa (a) corresponde al valor de control (a saber, queratinocitos sin tratar, preferiblemente presenescentes). Así pues, la etapa (c) comprende la selección de los compuestos en los que se mide una inhibición de la expresión de al menos el 20%, preferiblemente de al menos el 30%, preferiblemente de al menos el 40%, o una inhibición de la actividad de al menos el 20%, preferiblemente de al menos el 30%, preferiblemente de al menos el 40%, de al menos un microARN
- 35 en los queratinocitos, preferiblemente presenescentes, tratados en (a) en comparación con los mismos queratinocitos, preferiblemente presenescentes, antes de la etapa (a).

- 40 De acuerdo con otra realización, el procedimiento comprende una primera etapa (a') de preparación de muestras de queratinocitos, preferiblemente presenescentes. Así pues, preferiblemente, la presente invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para detectar compuestos candidatos que previenen y/o atenúan el envejecimiento de la piel, y/o que hidratan la piel, que comprende las etapas siguientes:

- a'. preparar al menos dos muestras de queratinocitos, preferiblemente presenescentes;
- a. poner en contacto una de las muestras con al menos un compuesto problema; luego
- b. medir la expresión o la actividad de al menos un microARN en dichas muestras; y
- c. seleccionar los compuestos en los que se mide una inhibición de la expresión de al menos el 20%, preferiblemente de al menos el 30%, preferiblemente de al menos el 40%, o una inhibición de la actividad de al menos el 20%, preferiblemente de al menos el 30%, preferiblemente de al menos el 40%, de al menos un microARN
- 45 en los queratinocitos, preferiblemente presenescentes, tratados en (a) en comparación con la muestra de queratinocitos sin tratar, preferiblemente presenescentes.

- 50 En esta segunda realización, la expresión o la actividad de los microARN medidos en la muestra de queratinocitos, preferiblemente presenescentes, no sometidos a la etapa (a), corresponde al valor de control (a saber, queratinocitos sin tratar, preferiblemente presenescentes).

Mediante la expresión «envejecimiento de la piel» se pretende hacer referencia a cualquier cambio de la apariencia externa de la piel debido al envejecimiento, tanto si es cronobiológica como si es fotoinducida, tal como, por ejemplo, arrugas marcadas y superficiales, piel macilenta, piel flácida, piel delgada y piel que carece de elasticidad y/o tono, y también cualquier cambio interno de la piel que no se refleja sistémicamente en un cambio de apariencia externo, tal como, por ejemplo, cualquier degradación interna de la piel, en particular del colágeno, tras la exposición a la radiación ultravioleta.

Mediante «hidratación de la piel» se quiere hacer referencia a que se mantiene la humedad natural de la piel y se evita que se seque.

Preferiblemente, los miR de interés de la etapa (b) actúan selectivamente sobre la proteína p63 y/o el ARNm de p63 y/o el gen correspondiente (a saber, TP63 en los humanos). Así pues, preferiblemente, los miR de interés de la etapa (b) actúan selectivamente sobre el gen TP63 o el ARNm de p63.

Preferiblemente, los miR se eligen del grupo que consiste en miR-130a, miR-138, miR-181a y miR-191.

miR-130a es de SEQ ID n.º 1. Es la secuencia HGNC: 31514;

miR-138 es de SEQ ID n.º 2. Es la secuencia HGNC: 31524;

miR-181a es de SEQ ID n.º 3. Es la secuencia HGNC: 31590;

miR-191 es de SEQ ID n.º 4. Es la secuencia HGNC: 31561.

Estas secuencias proceden de la base de datos HGNC.

Los compuestos problema analizados pueden ser de cualquier tipo. Pueden ser de origen natural o pueden haberse producido por síntesis química. Esto puede implicar una colección de compuestos químicos definidos estructuralmente, compuestos o sustancias sin caracterizar, o una mezcla de compuestos.

Los compuestos naturales incluyen compuestos de origen animal o vegetal, como plantas y animales. Preferiblemente, los compuestos problema son vegetales, preferiblemente elegidos de extractos de plantas.

Los queratinocitos presenescentes utilizados en las etapas (a') y (a) de más arriba son un modelo celular para la senescencia replicativa. Estos queratinocitos presenescentes se obtienen después de 37 duplicaciones de la población en las condiciones de cultivo clásicas. Las condiciones de cultivo clásicas comprenden un cultivo de los queratinocitos en el medio EpiLife que lleva complementos de crecimiento HKGS y que se mantienen constantemente en un estado de subconfluencia.

Preferiblemente, se obtienen gracias al procedimiento siguiente:

Los queratinocitos primarios neonatales de la epidermis humana se cultivan en un medio apropiado. Tal medio puede ser el medio EpiLife que lleva los complementos de crecimiento HKGS. Se mantienen constantemente en subconfluencia. A las células se les da un pase tras el periodo de tiempo apropiado, normalmente una vez a la semana.

En cada pase, una porción de las células se recoge y se analiza para medir las duplicaciones de la población, el tiempo de generación de la población, los marcadores bioquímicos de la senescencia y el ciclo celular.

Las duplicaciones de la población de queratinocitos primarios de humano se mide durante 40 días de cultivo. Tras 37 duplicaciones de la población, la curva de crecimiento alcanza un valor meseta, lo que muestra que las células dejan de dividirse y alcanzan el estado de senescencia. El análisis del marcador de la proliferación (p63), del marcador de la diferenciación (K10) y de los marcadores de senescencia (p16/INK) sugiere que mientras que el marcador de la proliferación disminuye, las células no se están diferenciando. Las células sufren la senescencia replicativa desde el cuarto pase a las 37 duplicaciones de la población. Además, el porcentaje de células proliferativas disminuye durante la senescencia.

De acuerdo con la etapa (a), el compuesto problema se pone en contacto con una muestra de queratinocitos, preferiblemente presenescentes.

De acuerdo con la etapa (b), en dichos queratinocitos, preferiblemente presenescentes, se mide la expresión y/o la actividad de al menos un microARN.

La terminología «expresión de un microARN» pretende hacer referencia a la cantidad de microARN producido.

La terminología «actividad de un microARN» pretende hacer referencia a la capacidad que tiene dicho microARN para inhibir el nivel del ARNm al cual se hibrida.

Los expertos en la técnica están familiarizados con las técnicas para detectar el ARNm al cual se hibrida dicho microARN de forma cuantitativa o semicuantitativa y, así pues, determinar la actividad de dicho microARN. Las

técnicas basadas en la hibridación del ARNm con sondas nucleotídicas específicas son las más habituales, como la transferencia de tipo Northern, la RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa acoplada a la retrotranscriptasa), RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR, por su nombre en inglés).

5 Los expertos en la técnica también están familiarizados con las técnicas de detección cuantitativa o semicuantitativa del microARN, o del ARNm al cual se hibrida dicho microARN. En particular, la expresión del microARN se puede medir por PCR en tiempo real. La actividad del microARN se puede medir por PCR en tiempo real sobre las dianas de ARNm, o mediante la evaluación de la concentración de la proteína de la diana mediante transferencia de tipo Western. Otra posibilidad es que, si se desconoce la diana, la actividad del microARN se puede analizar mediante la evaluación del efecto biológico del propio microARN, tal como un efecto sobre la tinción de la β -gal o sobre la proliferación.

10 Preferiblemente, la expresión del microARN se mide por PCR en tiempo real.

La expresión o actividad del microARN tras el tratamiento con el compuesto problema se compara luego con un valor de control, a saber, un valor obtenido en los mismos queratinocitos (preferiblemente presenescentes) antes del tratamiento, o un valor obtenido en otra muestra de queratinocitos (preferiblemente presenescentes) que están sin tratar.

15 De acuerdo con la etapa (c), los compuestos útiles son aquéllos en los que se mide una inhibición de la expresión de al menos el 20%, preferiblemente de al menos el 30%, preferiblemente de al menos el 40%, o una inhibición de la actividad de al menos el 20%, preferiblemente de al menos el 30%, preferiblemente de al menos el 40%, de al menos un microARN en los queratinocitos tratados, preferiblemente presenescentes, en comparación con los queratinocitos sin tratar, preferiblemente presenescentes. Preferiblemente, la inhibición de la expresión o de la actividad de dicho microARN es de al menos el 50%, preferiblemente de al menos el 60%.

20 Los compuestos seleccionados a través de los procedimientos de cribado definidos en la presente memoria se pueden analizar posteriormente en otros modelos *in vitro* y/o en modelos *in vivo* (en animales o humanos) para detectar sus efectos sobre el envejecimiento de la piel y/o la hidratación de la piel. Los compuestos útiles de acuerdo con la invención son los inhibidores del microARN deseado.

25 Un objeto de la invención es también el uso cosmético de un inhibidor de al menos un microARN, en donde dicho inhibidor se identifica de acuerdo con el método descrito anteriormente, para la prevención y/o la atenuación del envejecimiento de la piel y/o para la hidratación de la piel.

30 De acuerdo con otro aspecto, un objeto de la presente invención es el uso de al menos un inhibidor de microARN, en donde dicho inhibidor se identifica de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente, para fabricar una composición cosmética para la prevención y/o la atenuación del envejecimiento de la piel y/o para la hidratación de la piel. Así pues, la presente invención también se refiere al uso de al menos un inhibidor de microARN, en donde dicho inhibidor se identifica de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente, para la prevención y/o la atenuación del envejecimiento de la piel y/o para la hidratación de la piel.

35 El inhibidor se refiere a un compuesto que elimina o reduce sustancialmente la expresión o la actividad del microARN. La terminología «sustancialmente» significa una reducción de al menos el 20%, preferiblemente de al menos el 30%, preferiblemente de al menos el 40%, preferiblemente de al menos el 50% y más preferiblemente de al menos el 60%.

40 El inhibidor de microARN se puede utilizar a una proporción de 0,001 al 10% en peso, preferiblemente a una proporción del 0,01 al 5% en peso de la composición.

El inhibidor puede ser un polinucleótido antisentido de ARN o ADN, o un siARN. Preferiblemente, los inhibidores del microARN (miR) son anti-miR.

45 Los anti-miR son inhibidores de miR que inhiben específicamente los miR endógenos. Los anti-miR son ácidos nucleicos monocatenarios diseñados para que se fijen específicamente a las moléculas de microARN endógeno y las inhiban. Los anti-miR tienen una secuencia de ácido nucleico complementaria a la secuencia del miR diana. Estos inhibidores listos para usar se pueden introducir en las células con parámetros de transfección o electroporación similares a los utilizados para los siARN, y permiten el estudio detallado de los efectos biológicos de los miR. El uso de los anti-miR permite el análisis funcional de los miR mediante la disminución de la actividad de los miR.

50 Los anti-miR están disponibles en el mercado; pueden, por ejemplo, comprarse a Ambion o a Applied Biosystems.

A partir de la bibliografía, es posible que la inhibición al 70% de la expresión del miR surta efecto sobre la inducción/inhibición de la senescencia en las células normales humanas (Menguini R, Casagrande V, Cardellini M, Martelli E, Terrinoni A, Amati F, Vasa-Nicotera M, Ippoliti A, Novelli G, Melino G, Lauro R, Federici M., «MicroRNA 217 modulates endothelial cell senescence via silent information regulator 1». *Circulation*. 2009; 120 (15): 1524-32).

- Los inhibidores de los miR identificados gracias al procedimiento de cribado descrito anteriormente se pueden formular dentro de una composición, en combinación con un vehículo fisiológicamente aceptable, preferiblemente un medio cosméticamente aceptable, a saber, un medio que es idóneo para ser usado en contacto con la piel humana sin ningún riesgo de toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad o respuesta alérgica, y que no causa en especial ninguna sensación de malestar (eritema, irritación, escozor, etc) que el usuario no pueda soportar. Estas composiciones se pueden administrar, por ejemplo, por vía oral o tópica. Preferiblemente, la composición se aplica por vía tópica. Mediante la administración oral, la composición puede estar en forma de comprimidos, cápsulas de gel, comprimidos revestidos de azúcar, jarabes, suspensiones, soluciones, polvos, gránulos, emulsiones, suspensiones de microesferas o nanoesferas o vesículas lipídicas o poliméricas para la liberación controlada.
- 5
- 10 Mediante la administración tópica, la composición se utiliza más en particular para tratar la piel y las membranas mucosas, y puede estar en forma de bálsamos, cremas, leches, ungüentos, polvos, almohadillas impregnadas, soluciones, geles, pulverizadores, lociones o suspensiones. También puede estar en forma de suspensiones de microesferas o nanoesferas o vesículas lipídicas o poliméricas o parches poliméricos o hidrogeles para la liberación controlada. Esta composición para la administración tópica puede ser en forma anhidra, en forma acuosa o en forma de una emulsión. La composición para la administración tópica puede ser en forma de una emulsión de aceite en agua, de agua en aceite o múltiple (W/O/W, por su nombre en inglés o O/W/O, por su nombre en inglés), que puede ser opcionalmente microemulsiones o nanoemulsiones, o en forma de una dispersión acuosa, una solución, un gel acuoso o un polvo. En una variante preferida, la composición es en forma de un gel, de una crema o de una loción.
- 15

El vehículo fisiológicamente aceptable de la composición por lo general comprende agua y opcionalmente otros disolventes, tal como etanol.

20

Esta composición se utiliza preferiblemente como un producto de cuidado y/o limpieza para la piel facial y/o corporal, y puede estar especialmente en forma de un líquido, un gel o una espuma, acondicionado, por ejemplo, en una botella con bomba dispensadora, un aerosol o un tubo, o en forma de una crema acondicionada, por ejemplo, en un tarro. Como variante, puede estar en forma de un producto de maquillaje y en particular una base o un polvo suelto o compacto.

25

Puede comprender diferentes adyuvantes, tal como al menos un compuesto elegido entre:

- Aceites, que se pueden elegir especialmente entre: aceites de silicona volátiles o no volátiles, cíclicos o lineales, tal como polidimetilsiloxanos (dimeticonas), polialquilociclosiloxanos (ciclometiconas) y polialquilfenilsiloxanos (fenildimeticonas); aceites sintéticos tales como aceites fluorados, alquilbenzoatos e hidrocarburos ramificados tal como poliisobutileno; aceites vegetales especialmente aceite de soja o aceite de jojoba; y aceites minerales tales como vaselina líquida;

30

- Ceras tal como ozoquerita, cera de polietileno, cera de abeja o cera del Brasil;
- Elastómeros de silicona obtenidos especialmente al hacer reaccionar, en presencia de un catalizador, de un polisiloxano que contiene al menos un grupo reactivo (en especial hidrógeno o vinilo) y que lleva al menos un grupo alquilo (en especial metilo) o fenilo, en una posición lateral y/o terminal, con una organosilicona tal como un organohidrogenopolisiloxano;

35

- Tensioactivos, preferiblemente tensioactivos emulsionantes, bien no aniónicos, aniónicos, catiónicos o anfóteros, y en particular ésteres de ácido graso y polioles tales como ésteres de ácido graso y glicerol, ésteres de ácido graso y sorbitano, ésteres de ácido graso y polietilenglicol, y ésteres de ácido graso y sacarosa; éteres de alquilo graso y polietilenglicol; alquilpoliglucósidos; poliéteres modificados con polisiloxano; betaína y derivados de la misma; policuaternios; sales de sulfato de alquilo graso etoxiladas; sulfosuccinatos; sarcosinatos; fosfatos de alquilo y dialquilo; y sales de los mismos; y jabones de ácidos grasos.

40

- Cotensioactivos tales como alcoholes grasos lineales y, en particular, alcohol cetílico y alcohol estearílico;
- Espesantes y/o gelificantes, y en particular homopolímeros y copolímeros hidrófilos o anfóteros entrecruzados o sin entrecruzar, de ácido acriloilmetilpropanosulfónico (AMPS) y/o de acrilamida y/o de ácido acrílico y/o de sales o ésteres de ácido acrílico; goma de xantano o goma guar; derivados de celulosa; y gomitas de silicona (dimeticonol);

45

- Agentes de cribado orgánicos, tales como derivados de dibenzoilmetano (entre ellos, butilmetoxidibenzoilmetano), derivados del ácido cinámico (entre ellos metoxicinamato de etilhexilo), salicilatos, ácidos para-aminobenzoicos, acrilatos de β,β' -difenilo, benzofenonas, derivados de bencilidenocanfor, fenilbencimidazoles, triazinas, fenilbenzotriazoles y derivados antranílicos;

50

- Agentes de cribado inorgánicos, formados por óxidos minerales en forma de pigmentos o nanopigmentos revestidos o sin revestir, y en particular los formados por dióxido de titanio u óxido de cinc;
- Colorantes;

55

- Conservantes;

- Atrapadores tales como sales de EDTA;
- Fragancias;
- y mezclas de los mismos, sin limitarse a esta lista.

5 Ejemplos de tales adyuvantes se mencionan en especial en el diccionario CTFA (International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook publicado por The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, 11.^a edición, 2006), que describe una amplia variedad, sin limitación, de ingredientes cosméticos y farmacéuticos que se suelen utilizar en la industria del cuidado de la piel, que son idóneos para ser usados como ingredientes adicionales en las composiciones de acuerdo con la presente invención.

10 La composición también puede comprender al menos un compuesto con un efecto óptico, tales como sustancia de relleno, pigmentos, nácares, tensores y polímeros de efecto mate, y mezclas de los mismos.

15 La terminología «sustancia de relleno» se debe saber que se refiere a las partículas incoloras o blancas, minerales o sintéticas, laminares o no laminares idóneas para dar cuerpo o rigidez y/o flacidez a la composición, un efecto mate y uniformidad inmediatamente al aplicarlo. Las sustancias de relleno que pueden mencionarse en especial incluyen talco, mica, sílice, caolín, polvos de Nylon® tales como Nylon-12 (Orgasol® vendido por la compañía Atochem), polvos de polietileno, polvos de poliuretano, polvos de poliestireno, polvos de poliéster, opcionalmente almidón modificado, microperlas de resina de silicona tales como las vendidas por la compañía Toshiba con el nombre Tospearl®, hidroxipatita y microesferas de sílice huecas (Silica Beads® de la compañía Maprecos).

20 La terminología «pigmentos» se debe saber que hace referencia a las partículas blancas o coloreadas, minerales u orgánicas que son insolubles en el medio, que se diseñaron para colorear y/o dar opacidad a la composición. Pueden ser de un tamaño estándar o nanométrico. Entre los pigmentos minerales que se pueden mencionar se encuentran el dióxido de titanio, el dióxido de circonio y el dióxido de cerio, y también óxido de cinc, óxido de hierro y óxido de cromo.

25 La terminología «nácares» se debe saber que hace referencia a las partículas iridiscentes que reflejan luz. Entre los nácares que se pueden contemplar, se pueden mencionar los hechos de madreperla natural, mica revestida con óxido de titanio, con óxido de hierro, con pigmento natural o con oxiclورو de bismuto, y también mica con titanio coloreada.

La concentración de la masa en la fase acuosa de estas sustancias de relleno y/o pigmentos y/o nácares es generalmente del 0,1% al 20% y preferiblemente del 0,2% al 7% en peso respecto al peso total de la composición.

30 La terminología «tensores» se debe saber que hace referencia a un compuesto idóneo para dar firmeza a la piel y, por medio de este efecto de tensión, hacer la piel suave y reducir o incluso eliminar inmediatamente las arrugas profundas y las superficiales de ella. Los tensores que se pueden mencionar incluyen polímeros de origen natural. La terminología «polímero de origen natural» hace referencia a los polímeros de origen vegetal, polímeros procedentes de tegumentos, proteínas de huevo o distintos látex de origen natural. Estos polímeros son preferiblemente hidrófilos. Los polímeros de origen vegetal que se pueden mencionar especialmente incluyen proteínas e hidrolizados de proteínas, y más en particular los extractos de cereales, de legumbres y de plantas que producen aceite, tales como extractos de maíz, de centeno, de trigo, de trigo sarraceno, de ajonjolí, de espelta, de guisante, de judía, de lenteja, de soja y de altramuz. Los polímeros sintéticos están por lo general en forma de un látex o unseudolátex, y puede ser de tipo policondensado u obtenerse mediante polimerización de radicales libres. Se deben mencionar en especial las dispersiones de poliéster/poliuretano y poliéster/poliuretano. Preferiblemente, el tensor es un copolímero de PVP/acrilato de dimeticonilo y de poliuretano hidrófilo (Aquamere S-2001® de la compañía Hydromer).

45 La terminología «polímeros de efecto mate» hace referencia en la presente memoria a cualquier polímero en solución, en dispersión o en forma de partículas, que reduce el brillo de la piel y que unifica la complejión. Ejemplos que se pueden mencionar incluye elastómeros de silicona; partículas de resina; y mezclas de los mismos. Ejemplos de elastómeros de silicona que se pueden mencionar incluyen los productos vendidos con el nombre KSG® de la compañía Shin-Etsu, con el nombre Trefil®, BY29® o EPSX® de la compañía Dow Corning o con el nombre Gransil® de la compañía Grant Industries.

50 La composición utilizada de acuerdo con la invención también puede comprender agentes activos diferentes al inhibidor del microARN, y en particular al menos un agente activo elegido de entre: agentes que estimulan la producción de los factores de crecimiento; agentes de anti glucación o de desglucación; agentes que incrementan la síntesis del colágeno o que impiden su degradación (agentes anticologenasa y especialmente los inhibidores de la metaloproteasa de la matriz); agentes que incrementan la síntesis de elastina o que impiden su degradación (agentes antielastasa); agentes que estimulan la síntesis de la integrina o de constituyentes de la adhesión focal tal como la tensina; agentes que incrementan la síntesis de los glucosaminoglucanos o proteoglucanos o que impiden su degradación (agentes antiproteoglucanasa); agentes que incrementan la proliferación de fibroblastos; despigmentantes o antipigmentantes; antioxidantes o depuradores de radicales libres o agentes contra la polución; y mezclas de los mismos, sin que esta lista sea limitante.

Ejemplos de tales agentes son especialmente: extractos vegetales y en particular extractos de *Chondrus crispus*, de *Thermus thermophilus*, de *Pisum sativum* (Proteasyl® TP LS), de *Centella asiatica*, de *Scenedesmus*, de *Moringa pterygosperma*, de avellano, de *Castanea sativa*, de *Hibiscus sadriffa*, de *Polianthes tuberosa*, de *Argania spinosa*, de *Aloe vera*, de *Narcissus tazetta*, o de regaliz; un aceite esencial de *Citrus aurantium* (Neroli); α-hidroxiácidos tales como ácido glucólico, ácido láctico y ácido cítrico, y ésteres de los mismos; β-hidroxiácidos tales como ácido salicílico y sus derivados; hidrolizados de proteínas vegetales (en especial de soja o de avellana); oligopéptidos acilados (vendidos en especial por la compañía Sederma con los nombres comerciales Maxilip®, Matrixyl® 3000, Biopeptide® CL o Biopeptide® EL); extractos de levadura y en particular de *Saccharomyces cerevisiae*; extractos de algas y en particular de laminaria; vitaminas y derivados de las mismas tales como palmitato de retinilo, ácido ascórbico, glucósido de ascorbilo, fosfato de ascorbilo y de magnesio o sodio, palmitato de ascorbilo, tetrakisopalmitato de ascorbilo, sorbato de ascorbilo, tocoferol, acetato de tocoferilo y sorbato de tocoferilo; arbutina; ácido kójico; ácido elágico; y mezclas de los mismos.

Como variante, o además, la composición utilizada de acuerdo con la invención puede comprender al menos un inhibidor de la elastasa (antielastasa), tal como un extracto de semillas de *Pisum sativum* que vende especialmente la compañía Laboratoires Sérobiologiques/Cognis France con el nombre comercial Proteasyl TP LS®.

La composición también puede contener aditivos inertes o combinaciones de estos aditivos, tales como humectantes, estabilizantes, reguladores de la humedad, reguladores del pH, modificadores de la presión osmótica o protectores de UV-A y UV-B.

Los ejemplos que vienen a continuación ilustran la invención sin limitar el alcance de la misma. Estos ejemplos se basan en las figuras que se recogen a continuación:

Figura 1: establecimiento de un modelo para la senescencia replicativa en los queratinocitos primarios neonatales de humano («queratinocitos presenescentes»)

(A) Los queratinocitos primarios de humano se cultivaron en el medio EpiLife con complementos de crecimiento HKGS. Se cultivaron las células y se les dieron pases en serie hasta que alcanzaron el estado de senescencia. El gráfico muestra las duplicaciones de la población de queratinocitos primarios de humano durante 40 días de cultivo. Al cabo de 37 duplicaciones de la población aparece en la curva de crecimiento un valor meseta, lo que demuestra que las células dejan de dividirse y alcanzan el estado de senescencia.

(B) Se recogieron las células en los puntos de tiempo indicados para realizar el análisis de inmunotransferencia de tipo Western para p63, citoqueratina 10 y p16/INK4a. La disminución de la expresión de p63 y el incremento de la cantidad de p16/INK4a muestra que las células están entrando en el estado de senescencia replicativa, pero que no se están diferenciando, lo que se muestra al no poder detectar la citoqueratina 10 desde el primer al cuarto pase. La cantidad de la proteína β-actina se presenta como control de carga.

(C) El porcentaje de células en proliferación disminuye durante la senescencia, como demuestra el porcentaje de queratinocitos primarios de humano BrdU positivos en diferentes pases. La incorporación del BrdU se valoró con la tecnología Click-iT.

Figura 2: el miR-130a actúa selectivamente sobre la 3'-UTR del ARNm de p63

(A) Se predijo un sitio diana de miR-130a en la 3'-UTR de p63 con el programa informático TargetScan 5.1.

(B) La inserción de la 3'-UTR de p63 en un gen indicador como la luciferasa conduce a la disminución de la actividad luciferasa en presencia de miR-130a, según otras células de control transfectadas con miR-203.

(C) Análisis de inmunotransferencia de tipo Western que indica que la proteína ΔNp63 disminuye notablemente en los queratinocitos humanos transfectados con pre-miR-130a frente a los queratinocitos humanos transfectados con una secuencia desordenada. Como consecuencia de la sobreexpresión de miR-130a, los queratinocitos que sobreexpresan miR-130a incrementan la expresión de p16/INK4a, un marcador de la senescencia celular. La cantidad de la proteína β-actina se presenta como control de carga.

Figura 3: modulación de miR-130a mediante compuestos sintéticos

Se sembraron los queratinocitos primarios de humano en el medio EpiLife con complementos de crecimiento HKGS y se trataron con varios compuestos a diferentes concentraciones. Después de 48 horas se recogieron las células para la cuantificación relativa de la cantidad de miR-130a por PCR en tiempo real. El compuesto analizado disminuye significativamente la cantidad de miR-130a respecto a las células sin tratar.

Figura 4: el miR-138 actúa selectivamente sobre la 3'-UTR del ARNm de Sirt-1

(A) Se predijo un sitio diana de miR-138 en la 3'-UTR de Sirt-1 con el programa informático TargetScan 5.1. (B) La inserción de la 3'-UTR de Sirt-1 en un gen indicador como la luciferasa conduce a la disminución de la actividad luciferasa en presencia de miR-138. Se utilizó miR-217 como control positivo. (C) Análisis de inmunotransferencia de tipo Western que indica que la proteína Sirt-1 disminuye notablemente en los queratinocitos humanos transfectados

con pre-miR-138 frente a los queratinocitos humanos transfectados con una secuencia desordenada (Ctrl). La cantidad de la proteína β -actina se presenta como control de carga.

Figura 5: modulación de miR-138 por el anti-miR-138

- 5 Se sembraron los queratinocitos primarios de humano en el medio EpiLife con complementos de crecimiento HKGS y se transfectaron con anti-miR-138 (Ambion). Al cabo de 48 horas se recogieron las células para la cuantificación relativa de la cantidad de miR-138 por PCR en tiempo real. El anti-miR-138 disminuye significativamente la cantidad de miR-138 respecto a las células transfectadas con una secuencia desordenada.

Figura 6: el miR-181a actúa selectivamente sobre la 3'-UTR del ARNm de Sirt-1

- 10 (A) Se predijo un sitio diana de miR-181a en la 3'-UTR de Sirt-1 con el programa informático TargetScan 5.1. (B) La inserción de la 3'-UTR de Sirt-1 en un gen indicador como la luciferasa conduce a una disminución de la actividad luciferasa en presencia de miR-181a. Se utilizó el miR-217 como control positivo. (C) Análisis de inmunotransferencia de tipo Western que indica que la proteína Sirt-1 disminuye notablemente en los queratinocitos humanos transfectados con pre-miR-181a frente a los queratinocitos humanos transfectados con una secuencia desordenada (Ctrl). La cantidad de la proteína β -actina se presenta como control de carga.

- 15 Figura 7: modulación de miR-181a mediante el anti-miR-181a

Se sembraron los queratinocitos primarios de humano en el medio EpiLife con complementos de crecimiento HKGS y se transfectaron con anti-miR-181a (Ambion). Al cabo de 48 horas se recogieron las células para la cuantificación relativa de la cantidad de miR-181a por PCR en tiempo real. El anti-miR-181a disminuye significativamente la cantidad de miR-181a respecto a las células transfectadas con una secuencia desordenada.

- 20 Figura 8: el miR-191 actúa selectivamente sobre la 3'-UTR del ARNm de CDK6

- 25 (A) Se predijo un sitio diana de miR-191 en la 3'-UTR de CDK6 con el programa informático TargetScan 5.1. (B) La inserción de la 3'-UTR de CDK6 en un gen indicador como la luciferasa conduce a una disminución de la actividad luciferasa en presencia de miR-191. (C) Análisis de inmunotransferencia de tipo Western que indica que la proteína CDK6 disminuye notablemente en los queratinocitos humanos transfectados con pre-miR-191 frente a los queratinocitos humanos transfectados con una secuencia desordenada (Ctrl). La cantidad de la proteína β -actina se presenta como control de carga.

Figura 9: modulación de miR-191 por anti-miR-191

- 30 Se sembraron los queratinocitos primarios de humano en el medio EpiLife con complementos de crecimiento HKGS y se transfectaron con anti-miR-191 (Ambion). Al cabo de 48 horas se recogieron las células para la cuantificación relativa de la cantidad de miR-191 por PCR en tiempo real. El anti-miR-191 disminuye significativamente la cantidad de miR-191 respecto a las células transfectadas con una secuencia desordenada.

Figura 10: la sobreexpresión de miR-130a en los queratinocitos en proliferación inhibe los niveles de la proteína p63, pero no hay un efecto significativo sobre la proliferación ni sobre la inducción de la senescencia celular *in vitro*.

- 35 (A) No se detectaron efectos sobre la proliferación ni la senescencia tras la sobreexpresión de miR-130a.
 (B) Esto se confirma con la evaluación de la incorporación de BrdU y la tinción de la SA- β -galactosidasa. Estos resultados se deben al hecho de que miR-130a, en estas condiciones *in vitro* específicas, no es capaz de inhibir la p63 a niveles elevados. Al expresarse p63 todavía en las células como se observa en (C), no podemos detectar los efectos sobre la proliferación ni sobre la senescencia.

- 40 Figura 11: la sobreexpresión de miR-138 en los queratinocitos en proliferación inhibe la proliferación e induce la senescencia celular.

- (A) Tras la sobreexpresión de miR-138, la proliferación disminuye significativamente según se evalúa mediante la incorporación de BrdU.
 (B) La evaluación de la senescencia mediante la tinción de la SA- β -galactosidasa muestra un incremento significativo tras la transfección con miR-138 (\pm d. e. * valor de $p < 0,01$, ** valor de $p < 0,005$ mediante la prueba de la t de Student).

- Figura 12: la sobreexpresión de miR-181a en los queratinocitos en proliferación inhibe la proliferación e induce la senescencia celular.

- 50 (A) Tras la sobreexpresión de miR-181a, la proliferación disminuye significativamente según se evalúa mediante la incorporación de BrdU.
 (B) La evaluación de la senescencia mediante la tinción de la SA- β -galactosidasa muestra un incremento

significativo tras la transfección con miR-181a (\pm d.e. * valor de $p < 0,01$, ** valor de $p < 0,005$ mediante la prueba de la t de Student).

Figura 13: la sobreexpresión de miR-191 en los queratinocitos en proliferación inhibe la proliferación e induce la senescencia celular.

5 (A) Tras la sobreexpresión de miR-191, la proliferación disminuye significativamente según se evalúa mediante la incorporación de BrdU.

(B) La evaluación de la senescencia mediante la tinción de la SA- β -galactosidasa muestra un incremento significativo tras la transfección con miR-191 (\pm d. e. **valor de $p < 0,005$ mediante la prueba de la t de Student).

10 Figura 14: los miR seleccionados que se inducen durante la senescencia también se inducen en piel envejecida *in vivo*.

(A) Se tomaron biopsias de la piel de pacientes con las siguientes edades: carril 1 = 7 años; carril 2 = 10 años; carril 3 = 70 años y carril 4 = 76 años. Se exponen los análisis de inmunotransferencia de tipo Western que muestran que p16, SirT-1 y p63 se comportan en la piel humana como en el modelo de senescencia replicativa *in vitro* (B). (C-F) RT-PCR de los niveles de los miR seleccionados en la piel humana de diferentes edades.

15 Ejemplos

Ejemplo 1: Construcción de un modelo de queratinocitos en senescencia.

Material y métodos

Cultivo de células y transfección

10 Los queratinocitos primarios de la epidermis neonatal de humano (Hekn, Cascade, Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) se cultivaron en el medio EpiLife al que se añadieron complementos de crecimiento HKGS (Cascade). Las células se mantuvieron constantemente en subconfluencia para que no se desencadene un proceso de diferenciación. Las células solían recibir un pase una vez a la semana, y se anotaron en cada pase el número de células recogidas y el número de células inoculadas para calcular las duplicaciones de la población que se producen entre los pases y el tiempo de generación de la población. En cada pase se recogieron diferentes alícuotas de las células para extraer por triplicado el ARN y las proteínas, y en una alícuota se tiñó la β -galactosidasa activada por la senescencia para analizar si las células están en senescencia o sin senescencia.

Tinción de la β -galactosidasa asociada a la senescencia

30 Las células se hicieron crecer en placas de cultivo de 6 pocillos, se lavaron con PBS, y se fijaron con formaldehído al 2%/glutaraldehído al 0,2% en PBS durante 5 minutos. Después de otra etapa de lavado con PBS, las células se incubaron con la solución de tinción de la β -galactosidasa (150 mmol/l de NaCl, 2 mmol/l de $MgCl_2$, 5 mmol/l de ferriicianuro de potasio, 5 mmol/l de ferrocianuro de potasio, 40 mmol/l de ácido cítrico, 12 mmol/l de fosfato de sodio, pH 6,0, que contiene 1 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactósido [X-gal]) durante 24 horas a 37 °C. La reacción se detuvo al reemplazar la solución de tinción por glicerol al 70%.

Análisis de la proliferación celular y del ciclo celular

35 Los procedimientos utilizados para evaluar la proliferación celular se basan por lo general en la incorporación de análogos de la timidina, tal como bromodesoxiuridina (BrdU), durante la síntesis del ADN. El kit para análisis por citometría de flujo Click-iT™ EdU es una nueva alternativa al ensayo de BrdU (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.). Este procedimiento reemplaza la detección con anticuerpos del análogo nucleosídico, BrdU, por el EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina), que es un análogo nucleosídico de la timidina que se incorpora en el ADN durante la síntesis activa del ADN. Brevemente, se incubaron las células con EdU durante 4 horas. Tras la incubación, las muestras se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ciclo celular se analizó en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.). Se evaluaron 15.000 detecciones con los programas Cell Quest (BD) y Modfit LT (Verity Software; BD).

Análisis de inmunotransferencia de tipo Western

45 Los extractos celulares se resolvieron en un gel de poli(acrilamida con SDS), se transfirieron a una membrana de PVDF Hybond P (G & E Healthcare, GB). Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% en PBST, se incubaron con anticuerpos primarios durante 2 h a temperatura ambiente, se lavaron y se hibridaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario adecuado conjugado a la peroxidasa de rábano picante (conejo y ratón, BioRad, Hercules, California, EE.UU.). La detección se realizó con el kit de quimioluminiscencia ECL (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, EE.UU.).

50 Se utilizaron anticuerpos anti-p63 (Ab4, Neomarkers, Fremont, California, EE.UU.; dilución 1/500), anti-K10 policlonal (Covance, Princeton, Nueva Jersey, EE.UU.; dilución 1/1000), anti- β -actina (Sigma, St Louis, Minnesota,

EE.UU.; dilución 1/5000), anti-p16 (Santa Cruz Biotechnology, California, EE.UU.; dilución 1:1000).

Resultados

Establecimiento de un modelo para la senescencia replicativa en los queratinocitos primarios neonatales de humano

Se cultivaron los queratinocitos primarios de humano en el medio EpiLife con complementos de crecimiento HKGS. Las células se cultivaron y se les dieron pases en serie hasta que alcanzaron el estado de senescencia. La figura 1A muestra las duplicaciones de la población de queratinocitos primarios de humano durante 40 días de cultivo. Al cabo de 37 duplicaciones de la población, la curva de crecimiento presenta un valor meseta, que demuestra que las células dejan de dividirse y que alcanzan el estado de senescencia.

Las células se recogieron en p1, p3, p4 y p5 para realizar el análisis de inmunotransferencia de tipo Western para p63, citoqueratina 10 (K10) y p16/INK4a. La disminución de la expresión de p63 y el incremento de la cantidad de p16/INK4a muestra que las células entran en el estado de senescencia replicativa, pero que no se diferencian según se demuestra por la ausencia de citoqueratina 10 desde el primero al cuarto pase. La cantidad de la proteína β -actina se presenta como control de carga.

Los queratinocitos primarios de humano sufren la senescencia replicativa después del cuarto pase a las 37 duplicaciones de la población. La tinción de la SA- β -galactosidasa de los queratinocitos primarios de humano en diferentes pases muestra la expresión del marcador de senescencia en las células más viejas (p4).

El porcentaje de células en proliferación disminuye durante la senescencia, según demuestra el porcentaje de queratinocitos primarios de humano BrdU positivos en diferentes pases. La incorporación del BrdU se valoró con la tecnología de Click-iT. Las células así obtenidas son un modelo de queratinocitos en senescencia, y se llaman queratinocitos presenescentes.

Ejemplo 2: expresión de miR-130a durante la senescencia inducida de los queratinocitos

Material y métodos

Cultivo celular y transfección

En este ejemplo se utilizan los queratinocitos primarios de humano descritos en el ejemplo 1.

Los queratinocitos primarios de humano se cultivaron en el medio EpiLife con complementos de crecimiento HKGS (Cascade) y se trataron con 1,2 mM de CaCl_2 para inducir el proceso de diferenciación. Las células diferenciadas se recogieron 7 días después del tratamiento para analizarles la concentración del microARN. Los queratinocitos primarios de humano se transfectaron con pre-miR-130a humano, anti-miR-130a y el control negativo marcado con Cy3 (Ambion, Texas, EE.UU.) con el agente de transfección SiPORT neoFX (Ambion) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Transcurridas 16 horas desde la transfección, se retiró el medio y se reemplazó por medio nuevo.

Se sembraron 800.000 queratinocitos primarios de humano en el medio EpiLife con complementos de crecimiento HKGS y se trataron con los compuestos problema. Al cabo de 48 horas se recogieron las células para analizarles la concentración del microARN. Las células HEK 293E se hicieron crecer en D-MEM rico en glucosa y con STF al 10%, 100 U de penicilina y 100 μg de estreptomina (GIBCO, Invitrogen).

Las células HEK 293E se transfectaron con Lipofectamine 2000 de acuerdo con los protocolos del fabricante (Invitrogen). Las células Hekn se trataron con los compuestos problema durante 48 horas. Se recogieron las células y el ARNm extraído siguiendo procedimientos estándares. La PCR en tiempo real se realizó como se describe a continuación.

Extracción del ARN y análisis por PCR en tiempo real

El ARN total de las células o del tejido se aisló con el kit de aislamiento de microARN mirVana (Ambion) siguiendo el protocolo del fabricante para la extracción del ARN total. El ARN total se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, Delaware, EE.UU.) y la calidad del ARN se controló en un gel de agarosa. Para la detección del microARN, el ARN se retrotranscribió con el kit de retrotranscripción de microARN TaqMan y se realizó la qRT-PCR con la mezcla madre universal de TaqMan (Applied Biosystem) y cebadores específicos para miR-130a. Se utilizó U18 como control interno (Applied Biosystem). La expresión de cada gen y miR se definió a partir del ciclo umbral (C_t , por su nombre en inglés) y se calculó el nivel de expresión relativa con el procedimiento de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ después de la normalización por referencia a la expresión del gen de mantenimiento U18.

Tinción de la β -galactosidasa asociada a la senescencia

Las células se hicieron crecer en placas de cultivo de 6 pocillos, se lavaron con PBS, y se fijaron con formaldehído al 2%/glutaraldehído al 0,2% en PBS durante 5 minutos. Tras otra etapa de lavado con PBS, las células se incubaron con una solución de tinción de la β -galactosidasa (150 mmol/l de NaCl, 2 mmol/l de MgCl_2 , 5 mmol/l de ferrocianuro de potasio, 5 mmol/l de ferrocianuro de potasio, 40 mmol/l de ácido cítrico, 12 mmol/l de fosfato de sodio, pH 6,0,

que contiene 1 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indoilo-β-D-galactósido [X-gal] durante 24 horas a 37 °C. La reacción se detuvo al reemplazar la solución de tinción por glicerol al 70%.

Análisis de la proliferación celular y del ciclo celular

- Los procedimientos utilizados para evaluar la proliferación celular se basan por lo general en la incorporación de análogos de la timidina tales como la bromodesoxiuridina (BrdU) durante la síntesis del ADN. El kit de análisis por citometría de flujo Click-iT™ EdU es una nueva alternativa al ensayo de BrdU (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.). Este procedimiento reemplaza la detección con anticuerpos del análogo nucleosídico, BrdU, por el EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina), que es un análogo nucleosídico de la timidina que se incorpora en el ADN durante la síntesis activa del ADN. Brevemente, se incubaron las células con EdU durante 4 horas. Tras la incubación, las muestras se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se analizó el ciclo celular con un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.). Se evaluaron 15.000 detecciones con los programas Cell Quest (BD) y Modfit LT (Verity Software; BD).

Construcciones

- Se amplificó la 3'-UTR de la p63 humana por PCR en el ADN genómico de humano desde el primer nucleótido que hay después del codón de parada hasta el último nucleótido antes de la señal de poliadenilación con los cebadores siguientes:

p63UTR-SpeIF 5'- GGCCACTAGTGCCTCACCATGTGAGCTCTTC -3'; SEQ ID n.º 5

p63UTR-SpeIR 5'- GGCCACTAGTGCATGTCCTGGCAAACAAAAGAG -3'; SEQ ID n.º 6

- El fragmento de 2770 pb (a saber, la 3' UTR de tipo silvestre de la p63), después de la restricción de SpeI, se ligó a un vector compatible de control pGL3 linealizado con XbaI (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.).

Por otra parte, a partir de esta secuencia de tipo silvestre, el sitio diana predicho de miR-130a (7 pb, UUGCACU) se eliminó por PCR con los siguientes cebadores solapantes:

Del130F 5'- TTAATGAAAGAAAATTGAGTATTGACCATTTTTTAATT -3'; SEQ ID n.º 7

Del130R 5'- AATTA AAAAATGGTCAATACTCAATTTTCTTTCATTTAA -3'. SEQ ID n.º 8

- Por lo tanto, se obtiene la 3'-UTR miR-130a del de p63.

Bioinformática

El análisis de los sitios diana de miR-130a en la 3'-UTR de p63 se realizó con el programa informático TargetScan 5.1 disponible en <http://www.targetscan.org>

Ensayo luciferasa

- Se inocularon 2 x 10⁵ células HEK 293E en placas de 12 pocillos 24 horas antes de la transfección. Las células se transfectaron con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) con 100 ng de los vectores pGL3 (a saber, con la 3'-UTR de tipo silvestre de p63 o la 3'-UTR miR-130a del de p63), 12 pmol del pre-miR-130a o la secuencia desordenada del pre-miR (Ambion), y 10 ng del vector pRL-CMV con la luciferasa de *Renilla*. La actividad luciferasa de los extractos celulares se midió al cabo de 24 horas de la transfección, con un Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega); se midió la emisión de luz durante 10 segundos en un luminómetro OPTOCOMP I. La eficacia de la transfección se normalizó por la actividad de la luciferasa de *Renilla*.

Análisis de inmunotransferencia de tipo Western

- Todos los extractos celulares totales se resolvieron en un gel de poliacrilamida con SDS, se transfirieron a una membrana Hybond P PVDF (G & E Healthcare, Reino Unido). Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% en PBST, se incubaron con anticuerpos primarios durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavaron y se hibridaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario adecuado conjugado a la peroxidasa de rábano picante (conejo y ratón, BioRad, Hercules, California, EE.UU.). La detección se realizó con el kit de quimioluminiscencia ECL (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, EE.UU.).

- Se utilizaron anticuerpos anti-p63 (Ab4, Neomarkers, Fremont, California, EE.UU.; dilución 1/500), anti-β-actina (Sigma, St. Louis, Minnesota, EE.UU.; dilución 1/5000) y anti-p16 (Santa Cruz Biotechnology, California, EE.UU.; dilución 1:1000).

Resultados

Cantidad de miR-130a en los queratinocitos en diferenciación y en senescencia

Las células se recogieron en p1 y p4 para realizar la PCR en tiempo real.

La cuantificación relativa de la cantidad de miR-130a entre p1 y p4 muestra un incremento significativo de la expresión de miR-130a en los queratinocitos en senescencia: en p4, la expresión de miR-130a es aproximadamente un 1,48 ($\pm 0,08$) más alta que su expresión en p1 (que es igual a $1,00 \pm 0,07$).

- 5 Y al contrario, en los queratinocitos en proliferación, al cabo de 7 días de tratamiento con calcio, la expresión de miR-130a es de aproximadamente 0,347 ($\pm 0,04$), mientras que a día 0 es de 1,00 ($\pm 0,07$).

Por lo tanto, el estado de senescencia de los queratinocitos, pero no el estado en proliferación de los queratinocitos, está asociado a un incremento de la expresión de miR-130a.

miR-130a actúa selectivamente sobre la 3'-UTR del ARNm de p63

- 10 El análisis bioinformático muestra que p63 es una posible diana de miR-130a (figura 2A). La inserción de la 3'-UTR de tipo silvestre de p63 en un gen indicador como la luciferasa hace disminuir la actividad de la luciferasa en presencia del pre-miR-130a ($0,503 \pm 0,05$ veces sobre el control). Se transfectaron otras células de control con el pre-miR-203 (un miR que se sabe que actúa selectivamente sobre la 3'-UTR de p63) como control positivo: la actividad luciferasa en este caso está a $0,58 \pm 0,0096$ veces sobre el control (figura 2B).

- 15 La inserción de la 3'-UTR miR-130a del de p63 en un gen indicador como la luciferasa conduce a una ligera disminución de la actividad luciferasa en presencia de pre-miR-130a ($0,89 \pm 0,0537$ veces sobre el control). Otras células de control transfectadas con pre-miR-203 muestran una actividad luciferasa de $0,56 \pm 0,013$ veces sobre el control (figura 2B).

- 20 Tal y como se muestra en la figura 2C, la proteína p63 disminuye notablemente en los queratinocitos humanos transfectados con pre-miR-130a frente a los queratinocitos humanos transfectados con una secuencia desordenada. Como consecuencia de la sobreexpresión de miR-130a, los queratinocitos que sobreexpresan el miR-130a incrementan la expresión de p16/INK4a, un marcador de la senescencia celular. La cantidad de la proteína β -actina se presenta como control de carga.

Estos resultados sugieren que miR-130a actúa selectivamente sobre la 3'-UTR del ARNm de p63.

- 25 Modulación de miR-130a mediante compuestos sintéticos

Los queratinocitos primarios de humano se sembraron en el medio EpiLife con complementos de crecimiento HKGS y se trataron con un anti-miR-130a a diferentes concentraciones. Al cabo de 48 horas se recogieron las células para la cuantificación relativa de la cantidad de miR-130a por PCR en tiempo real. El anti-miR-130a disminuye significativamente la cantidad de miR-130a con respecto a las células sin tratar; la expresión de miR-130a en las células tratadas es sólo de $0,138 \pm 0,032$ (mientras que es $1,00 \pm 0,01$ para la secuencia desordenada) (figura 3).

- 30

Ejemplo 3: expresión de miR-138 durante la senescencia inducida en los queratinocitos

Material y métodos

Cultivo de células y transfección

En este ejemplo se utilizan los queratinocitos primarios de humano descritos en el ejemplo 1.

- 35 Los queratinocitos primarios de humano se cultivaron en el medio EpiLife con complementos de crecimiento HKGS (Cascade) y se trataron con 1,2 mM de CaCl_2 para inducir el proceso de diferenciación. Las células diferenciadas se recogieron al cabo de 7 días de tratamiento para analizar la cantidad del microARN. Los queratinocitos primarios de humano se transfectaron con pre-miR-138 humano, anti-miR-138 y el control negativo marcado con Cy3 (Ambion, Texas, EE.UU.) con el agente de transfección SiPORT neoFX (Ambion) de acuerdo con los protocolos del fabricante.
- 40 Transcurridas 16 horas desde la transfección se retiró el medio y se reemplazó por medio nuevo.

Se sembraron 800.000 queratinocitos primarios de humano en el medio EpiLife con complementos de crecimiento HKGS y se trataron con los compuestos problema. Al cabo de 48 horas se recogieron las células para analizar la cantidad del microARN. Las células HEK 293E se hicieron crecer en D-MEM rico en glucosa y con STF al 10%, 100 U de penicilina, 100 μg de estreptomina (GIBCO, Invitrogen).

- 45 Las células HEK 293E se transfectaron con Lipofectamine 2000 de acuerdo con los protocolos del fabricante (Invitrogen). Las células Hekn se trataron con los compuestos problema durante 48 horas. Las células se recogieron y el ARNm se extrajo siguiendo los procedimientos estándares. Se realizó la PCR en tiempo real como se describe a continuación.

Extracción del ARN y análisis por PCR en tiempo real

- 50 ARN total de las células o del tejido se aisló con el kit de aislamiento de microARN mirVana (Ambion) siguiendo el

protocolo del fabricante para la extracción del ARN total. El ARN total se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, Delaware, EE.UU.) y la calidad del ARN se controló en un gel de agarosa. Para la detección del microARN, el ARN se retrotranscribió con un kit de retrotranscripción de microARN TaqMan y se realizó la qRT-PCR con una mezcla madre universal para TaqMan (Applied Biosystem) y los cebadores específicos para el miR-138. Se utilizó U18 como control interno (Applied Biosystem). La expresión de cada gen y miR se definió a partir del ciclo umbral (Ct) y se calculó el nivel de expresión relativa con el procedimiento $2^{-\Delta\Delta Ct}$ después de la normalización por referencia a la expresión del gen de mantenimiento U18.

Tinción de la β -galactosidasa asociada a la senescencia

Las células se hicieron crecer en placas de cultivo de 6 pocillos, se lavaron con PBS, y se fijaron con formaldehído al 2%/glutaraldehído al 0,2% en PBS durante 5 minutos. Tras otra etapa de lavado con PBS, las células se incubaron con la solución de tinción de la β -galactosidasa (150 mmol/l de NaCl, 2 mmol/l de $MgCl_2$, 5 mmol/l de ferricianuro de potasio, 5 mmol/l de ferrocianuro de potasio, 40 mmol/l de ácido cítrico, 12 mmol/l de fosfato de sodio, pH 6,0, que contiene 1 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactósido [X-gal]) durante 24 horas a 37 °C. La reacción se detuvo al reemplazar la solución de tinción por glicerol al 70%.

15 Análisis de la proliferación celular y del ciclo celular

Los procedimientos utilizados para evaluar la proliferación celular se basan por lo general en la incorporación de análogos de la timidina, tal como bromodesoxiuridina (BrdU), durante la síntesis del ADN. El kit de análisis por citometría de flujo Click-iT™ EdU es una nueva alternativa al ensayo de BrdU (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.). Este procedimiento reemplaza la detección con anticuerpos del análogo nucleosídico, BrdU, por el EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina), que es un análogo nucleosídico de la timidina que se incorpora en el ADN durante la síntesis activa del ADN. Brevemente, las células se incubaron con EdU durante 4 horas. Después de la incubación, las muestras se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ciclo celular se analizó en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.). Se evaluaron 15.000 detecciones con los programas informáticos Cell Quest (BD) y Modfit LT (Verity Software; BD).

25 Construcciones

Se amplificó la 3'-UTR de Sirt-1 de humano por PCR desde el primer nucleótido que hay después del codón de parada hasta el último nucleótido antes de la señal de poliadenilación en el ADN genómico humano con los cebadores siguientes:

pSirT1UTR-StyIF 5'- GACCCTAGGAGATGATCAAGAGGC -3'; SEQ ID n.º 9

30 pSirT1UTR-StyIIR 5'- GCCTAGGAAGCTGTACAAATTGCT -3'. SEQ ID n.º 10

El fragmento de 1940 pb (a saber, la 3'-UTR de la pSirT1 de tipo silvestre), después de la restricción con SpeI, se ligó a un vector compatible de control pGL3 linealizado con XbaI (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.).

Por otra parte, a partir de esta secuencia de tipo silvestre, se eliminó el sitio diana predicho de miR-138 (7 pb, CACCAGCA) por PCR con los siguientes cebadores solapantes:

35 Del138F 5'- GCAGGTACAGGAATTGTTCTTAGGAACCTTTAGCATGTC -3'; SEQ ID n.º 11

Del138R 5'- GACATGCTAAAGTTCCTAAGGAACAATTCCTGTACCTGC -3'. SEQ ID n.º 12

Por lo tanto, se obtiene la 3'-UTR miR-138 del de SirT1.

Bioinformática

En análisis de los sitios diana de miR-138 en la 3'-UTR de Sirt-1 se realizó con el programa informático TargetScan 5.1 disponible en <http://www.targetscan.org/>.

Ensayo luciferasa

Se inocularon 2×10^5 células HEK 293E en placas de 12 pocillos 24 horas antes de la transfección. Las células se transfectaron con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) con 100 ng de los vectores pGL3 (a saber, con la 3'-UTR de tipo silvestre de Sirt-1 o la 3'-UTR miR-138 del de Sirt-1), 12 pmol de pre-miR-138 o de la secuencia desordenada de pre-miR (Ambion), y 10 ng del vector pRL-CMV con la luciferasa de *Renilla*. La actividad luciferasa de los extractos celulares se midió 24 horas después de la transfección, con un Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega); se midió la emisión de luz durante 10 segundos en un luminómetro OPTOCOMP I. La eficacia de la transfección se normalizó por la actividad de la luciferasa de *Renilla*.

Análisis de inmunotransferencia de tipo Western

Los extractos celulares totales se resolvieron en un gel de poliacrilamida con SDS, se transfirieron a una membrana Hybond P PVDF (G & E Healthcare, Reino Unido). Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% en PBST, se incubaron con anticuerpos primarios durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavaron y se hibridaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario adecuado conjugado a la peroxidasa de rábano picante (conejo y ratón, BioRad, Hercules, California, EE.UU.). La detección se realizó con el kit de quimioluminiscencia ECL (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, EE.UU.).

Se utilizaron anticuerpos anti-Sirt-1 (Abcam, Cambridge, Reino Unido; dilución 1/500), anti- β -actina (Sigma, St. Louis, Minnesota, EE.UU.; dilución 1/5000).

10 Resultados

Cantidad de miR-138 en los queratinocitos en diferenciación y en senescencia

Se recogieron las células en p1 y p4 para realizar la PCR en tiempo real. La cuantificación relativa de la cantidad de miR-138 entre p1 y p4 muestra un incremento significativo en la expresión de miR-138 en los queratinocitos en senescencia: en p4, la expresión de miR-138 está alrededor de 2,76 (\pm 0,06) más alto que su expresión en p1 (que es igual a 1,00 \pm 0,05).

Por otra parte, en los queratinocitos en proliferación, al cabo de 7 días de tratamiento con calcio, la expresión de miR-138 es de aproximadamente 0,21 (\pm 0,02), mientras que a día 0 es de 1,00 (\pm 0,02).

Por lo tanto, el estado de senescencia de los queratinocitos, pero no el estado de proliferación de los queratinocitos, está asociado a un incremento en la expresión de miR-138.

20 MiR-138 actúa selectivamente sobre la 3'-UTR del ARNm de Sirt-1

El análisis bioinformático muestra que Sirt-1 es una posible diana de miR-138 (figura 4A). La inserción de la 3'-UTR de tipo silvestre de Sirt-1 en un gen indicador como la luciferasa hace disminuir la actividad luciferasa en presencia del pre-miR-138 (0,39 \pm 0,014 veces sobre el control). Otras células de control se transfectaron con el pre-miR-217 (un miR que se sabe que actúa selectivamente sobre la 3'-UTR de Sirt-1) como control positivo: la actividad luciferasa en este caso es 0,35 \pm 0,009 veces sobre el control (figura 4B).

La inserción de la 3'UTR miR-138 del de Sirt-1 en un gen indicador como la luciferasa conduce a una ligera disminución de la actividad de la luciferasa en presencia de pre-miR-138 (0,78 \pm 0,03 veces sobre el control). Otras células de control transfectadas con el pre-miR-217 muestran una actividad luciferasa 0,4 \pm 0,008 veces sobre el control (figura 4B). Tal y como se muestra en la figura 4C, la proteína SirT1 disminuye notablemente en los queratinocitos humanos transfectados con el pre-miR-138 frente a los queratinocitos humanos transfectados con una secuencia desordenada (Ctrl). La cantidad de la proteína β -actina se presenta como control de carga. Estos datos demuestran que Sirt1 es una diana de miR-138.

Modulación de miR-138 mediante compuestos sintéticos

Los queratinocitos primarios de humano se sembraron en el medio EpiLife con complementos de crecimiento HKGS y se trataron con un anti-miR-138 a diferentes concentraciones. Al cabo de 48 horas se recogieron las células para la cuantificación relativa de la cantidad de miR-138 por PCR en tiempo real. El anti-miR-138 disminuye significativamente la cantidad de miR-138 respecto a las células sin tratar; la expresión de miR-138 en las células tratadas es sólo de 0,032 \pm 0,026 (figura 5).

Ejemplo 4: Expresión de miR-181a durante la senescencia inducida en los queratinocitos

40 Material y métodos

Cultivo de células y transfección

En este ejemplo se utilizan los queratinocitos primarios de humano descritos en el ejemplo 1.

Los queratinocitos primarios de humano se cultivaron en el medio EpiLife con complementos de crecimiento HKGS (Cascade) y se trataron con 1,2 mM de CaCl₂ para inducir el proceso de diferenciación. Las células diferenciadas se recogieron al cabo de 7 días de tratamiento para analizar la cantidad del microARN. Los queratinocitos primarios de humano se transfectaron con pre-miR-181a humano, anti-miR-181a y el control negativo marcado con Cy3 (Ambion, Texas, EE.UU.) utilizando el agente de transfección SiPORT neoFX (Ambion) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Al cabo de 16 horas de la transfección se retiró el medio y se reemplazó por medio nuevo.

Se sembraron 800.000 queratinocitos primarios de humano en el medio EpiLife con complementos de crecimiento HKGS y se trataron con los compuestos problema. Al cabo de 48 horas se recogieron las células para analizar la cantidad del microARN. Las células HEK 293E se hicieron crecer en D-MEM rico en glucosa y con STF al 10%, 100

U de penicilina, 100 µg de estreptomycin (GIBCO, Invitrogen).

Las células HEK 293E se transfectaron con Lipofectamine 2000 de acuerdo con los protocolos del fabricante (Invitrogen). Las células Hekn se trataron con los compuestos problema durante 48 horas. Las células se recogieron y el ARNm se extrajo siguiendo los procedimientos estándares. Se realizó la PCR en tiempo real como se describe a continuación.

Extracción del ARN y análisis por PCR en tiempo real

El ARN total de las células o del tejido se aisló con el kit de aislamiento de microARN mirVana (Ambion) siguiendo el protocolo del fabricante para la extracción del ARN total. El ARN total se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, Delaware, EE.UU.) y la calidad del ARN se controló en un gel de agarosa. Para la detección del microARN, el ARN se retrotranscribió con el kit de retrotranscripción de microARN TaqMan y se realizó la qRT-PCR con una mezcla madre universal para TaqMan (Applied Biosystem) y los cebadores específicos para el miR-181a. Se utilizó U18 como control interno (Applied Biosystem). La expresión de cada gen y miR se definió a partir del ciclo umbral (Ct) y se calculó el nivel de expresión relativa con el procedimiento $2^{-\Delta\Delta Ct}$ después de la normalización por referencia a la expresión del gen de mantenimiento U18.

15 Tinción de la β -galactosidasa asociada a la senescencia

Las células se hicieron crecer en placas de cultivo de 6 pocillos, se lavaron con PBS, y se fijaron con formaldehído al 2%/glutaraldehído al 0,2% en PBS durante 5 minutos. Tras otra etapa de lavado con PBS, las células se incubaron con la solución de tinción de la β -galactosidasa (150 mmol/l de NaCl, 2 mmol/l de $MgCl_2$, 5 mmol/l de ferricianuro de potasio, 5 mmol/l de ferrocianuro de potasio, 40 mmol/l de ácido cítrico, 12 mmol/l de fosfato de sodio, pH 6,0, que contiene 1 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactósido [X-gal]) durante 24 horas a 37 °C. La reacción se detuvo al reemplazar la solución de tinción por glicerol al 70%.

Análisis de la proliferación celular y del ciclo celular

Los procedimientos utilizados para evaluar la proliferación celular se basan por lo general en la incorporación de análogos de la timidina, tal como bromodesoxiuridina (BrdU), durante la síntesis del ADN. El kit de análisis por citometría de flujo Click-iT™ EdU es una nueva alternativa al ensayo de BrdU (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.). Este procedimiento reemplaza la detección con anticuerpos del análogo nucleosídico, BrdU, por el EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina), que es un análogo nucleosídico de la timidina que se incorpora en el ADN durante la síntesis activa del ADN. Brevemente, las células se incubaron con EdU durante 4 horas. Después de la incubación, las muestras se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ciclo celular se analizó en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.). Se evaluaron 15.000 detecciones con los programas informáticos Cell Quest (BD) y Modfit LT (Verity Software; BD).

Construcciones

Se amplificó la 3'-UTR de la Sirt-1 de humano por PCR desde el primer nucleótido que hay después del codón de parada hasta el último nucleótido antes de la señal de poliadenilación en el DNA genómico de humano con los cebadores siguientes:

pSirT1UTR-StylIF 5'- GACCCTAGGAGATGATCAAGAGGC -3'; SEQ ID n.º 13

pSirT1UTR-StylIR 5'- GCCTAGGAAGCTGTACAAATTGCT -3'. SEQ ID n.º 14

El fragmento de 1940 pb (a saber, la 3'-UTR de tipo silvestre de pSirT1), después de la restricción con SpeI, se ligó a un vector compatible de control pGL3 linealizado con XbaI (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.).

40 Por otra parte, a partir de esta secuencia de tipo silvestre, se eliminó el sitio diana predicho de miR-181a (7 pb, UGAAUGU) por PCR con los siguientes cebadores solapantes:

Del181aF 5'- GGAACCTTAGCATGTCAAAATTACTTGTGAACTCGATAGA -3'; SEQ ID n.º 15

Del181aR 5'- TCTATCGAGTTCACAAGTAATTTTGACATGCTAAAGTTCC -3'. SEQ ID n.º 16

Por lo tanto, se obtiene la 3'-UTR miR-181a del de SirT1.

45 Bioinformática

En análisis de los sitios diana de miR-181a en la 3'-UTR de Sirt-1 se realizó con el programa informático TargetScan 5.1 disponible en <http://www.targetscan.org/>.

Ensayo luciferasa

- Se inocularon 2×10^5 células HEK 293E en placas de 12 pocillos 24 horas antes de la transfección. Las células se transfectaron con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) con 100 ng de los vectores pGL3 (a saber, con la 3'-UTR de tipo silvestre de Sirt-1 o la 3'-UTR miR-181a del de Sirt-1), 12 pmol de pre-miR-181a o la secuencia desordenada del pre-miR (Ambion), y 10 ng del vector pRL-CMV con la luciferasa de *Renilla*. La actividad luciferasa de los extractos celulares se midió 24 horas después de la transfección, con un Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega); se midió la emisión de luz durante 10 segundos en un luminómetro OPTOCOMP I. La eficacia de la transfección se normalizó por la actividad de la luciferasa de *Renilla*.

Análisis de inmunotransferencia de tipo Western

- 10 Los extractos celulares totales se resolvieron en un gel de poliacrilamida con SDS, y se transfirieron a una membrana Hybond P PVDF (G & E Healthcare, Reino Unido). Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% en PBST, se incubaron con anticuerpos primarios durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavaron y se hibridaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario adecuado conjugado a la peroxidasa de rábano picante (conejo y ratón, BioRad, Hercules, California, EE.UU.). La detección se realizó con el kit de quimioluminiscencia ECL (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, EE.UU.). Se utilizaron anticuerpos anti-Sirt-1 (Abcam, Cambridge, Reino Unido; dilución 1/500), anti- β -actina (Sigma, St. Louis, Minnesota, EE.UU.; dilución 1/5000).

Resultados

Cantidad de miR-181a en los queratinocitos en diferenciación y en senescencia

- 20 Se recogieron las células en p1 y p4 para realizar la PCR en tiempo real. La cuantificación relativa de la cantidad de miR-181a entre p1 y p4 muestra un incremento significativo de la expresión de miR-181a en los queratinocitos en senescencia: en p4, la expresión de miR-181a está alrededor de $1,3 (\pm 0,05)$ más alto que su expresión en p1 (que es igual a $1,00 \pm 0,03$).

- 25 Por el contrario, en los queratinocitos en proliferación, al cabo de 7 días de tratamiento con calcio, la expresión de miR-181a es de aproximadamente $0,93 (\pm 0,029)$, mientras que a día 0 es de $1,00 (\pm 0,029)$.

Por lo tanto, el estado de senescencia de los queratinocitos, pero no el estado de proliferación de los queratinocitos, está asociado a un incremento de la expresión de miR-181a.

MiR-181a actúa selectivamente sobre la 3'-UTR del ARNm de Sirt-1

- 30 El análisis bioinformático sugiere que Sirt1 es una posible diana de miR-181a (figura 6A). La inserción de la 3'-UTR de tipo silvestre de Sirt-1 en un gen indicador como la luciferasa hace disminuir la actividad luciferasa en presencia del pre-miR-181a ($0,648 \pm 0,1$ veces sobre el control). Otras células de control se transfectaron con el pre-miR-217 (un miR que se sabe que actúa selectivamente sobre la 3'-UTR de Sirt-1) como control positivo: la actividad luciferasa en este caso está $0,35 \pm 0,0096$ veces sobre el control (figura 6B).

- 35 La inserción de la 3'-UTR miR-181a del de Sirt-1 en un gen indicador como la luciferasa conduce a una ligera disminución de la actividad luciferasa en presencia de pre-miR-181a ($0,93 \pm 0,09$ veces sobre el control). Otras células de control transfectadas con el pre-miR-217 muestran una actividad luciferasa $0,4 \pm 0,07$ veces sobre el control (figura 6B). Tal y como se muestra en la figura 6C, la proteína Sirt1 disminuye notablemente en los queratinocitos humanos transfectados con el pre-miR-181a frente a los queratinocitos humanos transfectados con una secuencia desordenada (Ctrl). La cantidad de la proteína β -actina se presenta como control de carga. Estos datos demuestran que Sirt1 es una diana de miR-181a.

Modulación de miR-181a mediante compuestos sintéticos

- 45 Los queratinocitos primarios de humano se sembraron en el medio EpiLife con complementos de crecimiento HKGS y se trataron con un anti-miR-181a a diferentes concentraciones. Al cabo de 48 horas se recogieron las células para la cuantificación relativa de la cantidad de miR-181a por PCR en tiempo real. El anti-miR-181a disminuye significativamente la cantidad de miR-181a con respecto a las células sin tratar; la expresión de miR-181a en las células tratadas es sólo de $0,075 \pm 0,052$ (mientras que es de $1,00 \pm 0,029$ para la secuencia desordenada) (figura 7).

Ejemplo 5: Expresión de miR-191 durante la senescencia inducida en los queratinocitos

Material y métodos

- 50 Cultivo de células y transfección

En este ejemplo se utilizan los queratinocitos primarios de humano descritos en el ejemplo 1. Los queratinocitos primarios de humano se cultivaron en el medio EpiLife con complementos de crecimiento HKGS (Cascade) y se

trataron con 1,2 mM de CaCl₂ para inducir el proceso de diferenciación. Las células diferenciadas se recogieron al cabo de 7 días de tratamiento para analizar la cantidad del microARN. Los queratinocitos primarios de humano se transfectaron con pre-miR-191 humano, anti-miR-191 y el control negativo marcado con Cy3 (Ambion, Texas, EE.UU.) utilizando el agente de transfección SiPORT neoFX (Ambion) de acuerdo con los protocolos del fabricante.

5 Al cabo de 16 horas de la transfección se retiró el medio y se reemplazó por medio nuevo.

Se sembraron 800.000 queratinocitos primarios de humano en el medio EpiLife con complementos de crecimiento HKGS y se trataron con los compuestos problema. Al cabo de 48 horas se recogieron las células para analizar la cantidad del microARN. Las células HEK 293E se hicieron crecer en D-MEM rico en glucosa y con STF al 10%, 100 U de penicilina, 100 µg de estreptomocina (GIBCO, Invitrogen).

10 Las células HEK 293E se transfectaron con Lipofectamine 2000 de acuerdo con los protocolos del fabricante (Invitrogen). Las células Hekn se trataron con los compuestos problema durante 48 horas. Las células se recogieron y el ARNm se extrajo siguiendo los procedimientos estándares. Se realizó la PCR en tiempo real según se describe a continuación.

Extracción del ARN y análisis por PCR en tiempo real

15 El ARN total de las células o del tejido se aisló con el kit de aislamiento de microARN mirVana (Ambion) siguiendo el protocolo del fabricante para la extracción del ARN total. El ARN total se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, Delaware, EE.UU.) y la calidad de ARN se controló en un gel de agarosa. Para la detección del microARN, el ARN se retrotranscribió con el kit de retrotranscripción de microARN TaqMan y se realizó la qRT-PCR con una mezcla madre universal para TaqMan (Applied Biosystem) y los cebadores específicos para el miR-191. Se utilizó U18 como control interno (Applied Biosystem). La expresión de cada gen y miR se definió a partir del ciclo umbral (Ct) y se calculó el nivel de expresión relativa con el procedimiento 2- $\Delta\Delta$ Ct después de la normalización por referencia a la expresión del gen de mantenimiento U18.

Tinción de la β -galactosidasa asociada a la senescencia

25 Las células se hicieron crecer en placas de cultivo de 6 pocillos, se lavaron con PBS, y se fijaron con formaldehído al 2%/glutaraldehído al 0,2% en PBS durante 5 minutos. Tras otra etapa de lavado con PBS, las células se incubaron con la solución de tinción de la β -galactosidasa (150 mmol/l de NaCl, 2 mmol/l de MgCl₂, 5 mmol/l de ferricianuro de potasio, 5 mmol/l de ferrocianuro de potasio, 40 mmol/l de ácido cítrico, 12 mmol/l de fosfato de sodio, pH 6,0, que contiene 1 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indoil- β -D-galactósido [X-gal]) durante 24 horas a 37 °C. La reacción se detuvo al reemplazar la solución de tinción por glicerol al 70%.

30 Análisis de la proliferación celular y del ciclo celular

Los procedimientos utilizados para evaluar la proliferación celular se basan por lo general en la incorporación de análogos de la timidina, tal como bromodesoxiuridina (BrdU), durante la síntesis del ADN. El kit de análisis por citometría de flujo Click-iT™ EdU es una nueva alternativa al ensayo de BrdU (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.). Este procedimiento reemplaza la detección con anticuerpos del análogo nucleosídico, BrdU, por el EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina), que es un análogo nucleosídico de la timidina que se incorpora en el ADN durante la síntesis activa del ADN. Brevemente, las células se incubaron con EdU durante 4 horas. Después de la incubación, las muestras se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ciclo celular se analizó en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.). Se evaluaron 15.000 detecciones con los programas informáticos Cell Quest (BD) y Modfit LT (Verity Software; BD).

40 Bioinformática

El análisis de los sitios diana de miR-191 en la 3'-UTR de CDK6 se realizó con el programa informático TargetScan 5.1 disponible en <http://www.targetscan.org/>.

Ensayo luciferasa

45 Se inocularon 2×10^5 células HEK 293E en placas de 12 pocillos 24 horas antes de la transfección. Las células se transfectaron con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) con 100 ng de los vectores pGL3, 12 pmol de pre-miR-191 o la secuencia desordenada del pre-miR (Ambion), y 10 ng del vector pRL-CMV con la luciferasa de *Renilla*. La actividad luciferasa de los extractos celulares se midió 24 horas después de la transfección, con un Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega); se midió la emisión de luz durante 10 segundos en un luminómetro OPTOCOMP I. La eficacia de la transfección se normalizó por la actividad de la luciferasa de *Renilla*.

50 Análisis de inmunotransferencia de tipo Western

Los extractos celulares totales se resolvieron en un gel de poliacrilamida con SDS, se transfirieron a una membrana Hybond P PVDF (G & E Healthcare, Reino Unido). Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% en PBST, se incubaron con anticuerpos primarios durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavaron y se hibridaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario adecuado conjugado a la peroxidasa

de rábano picante (conejo y ratón, BioRad, Hercules, California, EE.UU.). La detección se realizó con el kit de quimioluminiscencia ECL (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, EE.UU.).

Se utilizaron anticuerpos anti-CDK-6 policlonal (Santa Cruz, sc-177; dilución 1/2000), anti-β-actina (Sigma, St. Louis, Minnesota, EE.UU.; dilución 1/5000).

5 Resultados

Cantidad de miR-191 en los queratinocitos en diferenciación y en senescencia

Se recogieron las células en p1 y p4 para realizar la PCR en tiempo real. La cuantificación relativa de la cantidad de miR-191 entre p1 y p4 muestra un incremento significativo de la expresión de miR-191 en los queratinocitos en senescencia: en p4, la expresión de miR-191 está alrededor de 1,9 ($\pm 0,07$) más alto que su expresión en p1 (que es igual a 1,00 $\pm 0,04$). Al contrario, en los queratinocitos en proliferación, al cabo de 7 días de tratamiento con calcio, la expresión de miR-191 está en torno a 0,41 ($\pm 0,019$), mientras que a día 0 es de 1,00 ($\pm 0,02$).

Por lo tanto, el estado de senescencia de los queratinocitos, pero no el estado de proliferación de los queratinocitos, está asociado a un incremento de la expresión de miR-191.

miR-191 actúa selectivamente sobre la 3'-UTR del ARNm de CDK6

15 El análisis bioinformático sugiere que CDK6 es una posible diana de miR-191 (figura 8A). La inserción de la 3'-UTR de tipo silvestre de CDK6 en un gen indicador como la luciferasa hace disminuir la actividad luciferasa en presencia del pre-miR-191 (0,78 $\pm 0,1$ veces sobre el control) (figura 6B). Tal y como se muestra en la figura 8C, la proteína CDK6 disminuye notablemente en los queratinocitos humanos transfectados con el pre-miR-191 frente a los queratinocitos humanos transfectados con una secuencia desordenada (Ctrl). La cantidad de la proteína β-actina se presenta como control de carga. Estos datos demuestran que CDK6 es una diana de miR-191.

Modulación de miR-191 mediante compuestos sintéticos

25 Los queratinocitos primarios de humano se sembraron en el medio EpiLife con complementos de crecimiento HKGS y se trataron con un anti-miR-191 a diferentes concentraciones. Al cabo de 48 horas se recogieron las células para la cuantificación relativa de la cantidad de miR-191 por PCR en tiempo real. El anti-miR-191 disminuye significativamente la cantidad de miR-191 con respecto a las células sin tratar; la expresión de miR-191 en las células tratadas es sólo de 0,061 $\pm 0,049$ (mientras que es de 1,00 $\pm 0,019$ para la secuencia desordenada) (figura 9).

Ejemplo 6: sobreexpresión de miR-130a, miR-138, miR-181a y miR-191 en los queratinocitos en proliferación

Materiales y métodos

30 Cultivo celular y transfección

En este ejemplo se utilizan los queratinocitos primarios de humano descritos en el ejemplo 1. Los queratinocitos primarios de humano se cultivaron en el medio EpiLife con complementos de crecimiento HKGS (Cascade). Los queratinocitos primarios de humano se transfectaron con los pre-miR de humano 130a, 138, 181a, 191 y el control negativo marcado con Cy3 (Ambion, Texas, EE.UU.) utilizando el agente de transfección SiPORT neoFX (Ambion) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Al cabo de 16 horas de la transfección, el medio se retiró y se reemplazó por medio nuevo.

Tinción de la β-galactosidasa asociada a la senescencia

40 Las células se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos, se lavaron con PBS, y se fijaron con formaldehído al 2%/glutaraldehído al 0,2% en PBS durante 5 minutos. Tras otra etapa de lavado con PBS, las células se incubaron con la solución de tinción de la β-galactosidasa (150 mmol/l de NaCl, 2 mmol/l de MgCl₂, 5 mmol/l de ferricianuro de potasio, 5 mmol/l de ferrocianuro de potasio, 40 mmol/l de ácido cítrico, 12 mmol/l de fosfato de sodio, pH 6,0, que contiene 1 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indoilo-β-D-galactósido [X-gal]) durante 24 horas a 37 °C. La reacción se detuvo al reemplazar la solución de tinción por glicerol al 70%.

Análisis de la proliferación celular y del ciclo celular

45 Los procedimientos utilizados para evaluar la proliferación celular se basan por lo general en la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU), durante la síntesis del ADN. El kit de análisis por citometría de flujo Click-iT™ EdU es una nueva alternativa al ensayo de BrdU (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.). Este procedimiento reemplaza la detección con anticuerpos del análogo nucleosídico, BrdU, por el EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina), que es un análogo nucleosídico de la timidina que se incorpora en el ADN durante la síntesis activa del ADN. Brevemente, las células se incubaron con EdU durante 4 horas. Después de la incubación, las muestras se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ciclo celular se analizó en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.). Se evaluaron 15.000 detecciones con los programas informáticos Cell

Quest (BD) y Modfit LT (Verity Software; BD).

Análisis de inmunotransferencia de tipo Western

- Los extractos celulares totales se resolvieron en un gel de poliacrilamida con SDS, se transfirieron a una membrana Hybond P PVDF (G & E Healthcare, Reino Unido). Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% en PBST, se incubaron con anticuerpos primarios durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavaron y se hibridaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario adecuado conjugado a la peroxidasa de rábano picante (conejo y ratón, BioRad, Hercules, California, EE.UU.). La detección se realizó con el kit de quimioluminiscencia ECL (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, EE.UU.).
- 5 Se utilizaron anticuerpos anti-p63 (Ab4, Neomarkers, Fremont, California, EE.UU.; dilución 1/500), anti- β -actina (Sigma, St. Louis, Minnesota, EE.UU.; dilución 1/5000), anti-p16 (Santa Cruz Biotechnology, California, EE.UU.; dilución 1:1000).

Resultados

- La sobreexpresión de miR-130a en los queratinocitos no tiene un efecto significativo ni sobre la proliferación ni sobre la inducción de la senescencia celular en las condiciones *in vitro*
- 15

- Tras la sobreexpresión de miR-130a no se detectaron efectos sobre la proliferación ni la senescencia, según se evaluó mediante la incorporación de BrdU y la tinción de la SA- β -galactosidasa (figura 10). Estos resultados se deben al hecho de que miR-130a, en estas condiciones específicas *in vitro*, no es capaz de inhibir completamente la expresión de p63. Al expresarse p63 todavía en las células tras la transfección con miR-130a (véase la figura 11C), no podemos detectar los efectos sobre la proliferación ni sobre la senescencia. Sin embargo, el miR-130a está inducido *in vivo* en los queratinocitos de sujetos ancianos (véase más adelante, figura 14) y en la senescencia inducida replicativa (véase el ejemplo 2), lo que demuestra su implicación en la senescencia celular.
- 20

La sobreexpresión de miR-138 en los queratinocitos es suficiente para inhibir la proliferación e inducir la senescencia celular

- 25 Tras la sobreexpresión de miR-138 en los queratinocitos en proliferación, detectamos un fuerte efecto sobre la inhibición de la proliferación según se evaluó mediante la incorporación de BrdU y la tinción de la SA- β -galactosidasa (figura 11), lo que indica que miR-138 es suficiente por sí mismo para inducir la senescencia. La evaluación estadística muestra que durante la transfección con miR-138 varían significativamente (\pm d.e. * valor de $p < 0,01$, ** valor de $p < 0,005$ mediante la prueba de la t de Student) (figura 11) la proliferación y la inducción de la senescencia.
- 30

La sobreexpresión de miR-181a en los queratinocitos es suficiente para inhibir la proliferación e inducir la senescencia celular

- Tras la sobreexpresión de miR-181a en los queratinocitos en proliferación, detectamos un fuerte efecto sobre la inhibición de la proliferación según se evaluó mediante la incorporación de BrdU y la tinción de la SA- β -galactosidasa (figura 12), lo que indica que miR-181a es suficiente por sí mismo para inducir la senescencia. La evaluación estadística muestra que durante la transfección con miR-181a varían significativamente (\pm d.e. * valor de $p < 0,01$, ** valor de $p < 0,005$ mediante la prueba de la t de Student) (figura 11) la proliferación y la inducción de la senescencia.
- 35

- La sobreexpresión de miR-191 en los queratinocitos es suficiente para inhibir la proliferación e inducir la senescencia celular
- 40

- Tras la sobreexpresión de miR-191, detectamos un fuerte efecto sobre la inhibición de la proliferación según se evaluó mediante la incorporación de BrdU y la tinción de la SA- β -galactosidasa (figura 13), lo que indica que miR-191 es suficiente por sí mismo para inducir la senescencia. La evaluación estadística muestra que durante la transfección con miR-191 varían significativamente (\pm d. e. * valor de $p < 0,01$, ** valor de $p < 0,005$ mediante la prueba de la t de Student) (figura 13) la proliferación y la inducción de la senescencia.
- 45

Ejemplo 7: expresión de miR-130a, miR-138, miR-181a y miR-191 en los queratinocitos obtenidos de sujetos jóvenes y ancianos

Material y métodos

- Células y condiciones de cultivo, análisis de inmunotransferencia de tipo Western y análisis de los miR de biopsias de piel
- 50

Siguiendo el procedimiento descrito en Cordisco et al., *JID* 130: 1048-1062 (2010) se obtuvieron extractos de proteínas de queratinocitos de piel humana de individuos jóvenes y ancianos por el Departamento de Dermatología

(IDI-IRCCS, por su nombre en inglés). Las cuantificaciones relativas de miR-130a, miR-138, miR-181a y miR-191 se realizaron como ya se describió en los ejemplos 2 a 5, respectivamente.

Análisis de inmunotransferencia de tipo Western

- 5 Los extractos celulares totales se resolvieron en un gel de poliacrilamida con SDS, se transfirieron a una membrana Hybond P PVDF (G & E Healthcare, Reino Unido). Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% en PBST, se incubaron con anticuerpos primarios durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavaron y se hibridaron durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario adecuado conjugado a la peroxidasa de rábano picante (conejo y ratón, BioRad, Hercules, California, EE.UU.). La detección se realizó con el kit de quimioluminiscencia ECL (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, EE.UU.).

Se utilizaron anticuerpos anti-p63 (Ab4, Neomarkers, Fremont, California, EE.UU.; dilución 1/500), anti- β -actina (Sigma, St. Louis, Minnesota, EE.UU.; dilución 1/5000), anti-p16 (Santa Cruz Biotechnology, California, EE.UU.; dilución 1:1000), anti-Sirt-1 (Abcam, Cambridge, Gran Bretaña; dilución 1/500).

Resultados

- 15 Para validar nuestro hallazgo en los sujetos humanos, hemos estudiado la expresión de p63 y Sirt1 en los queratinocitos aislados de sujetos jóvenes (7 y 10 años) y ancianos (70 y 76 años). El análisis por inmunotransferencia de tipo Western indica que los niveles de expresión de p63 y Sirt1 son elevados en los queratinocitos de sujetos jóvenes en comparación con los sujetos ancianos (figura 14A). Esto fue similar a la senescencia replicativa *in vitro* e inducida (figura 14B). Mediante la PCR en tiempo real, evaluamos el nivel de expresión de los miR en las células de los sujetos seleccionados (figuras 14C-F). miR-130a, miR-138, miR-181a y miR-191 se inducen también *in vivo* en los queratinocitos de los sujetos ancianos (véase figura 14) en comparación con los jóvenes, lo que demuestra que estos microARN que están implicados en la senescencia también lo están en la piel envejecida *in vivo*.

Ejemplo 8 : compuestos activos

- 25 Material y métodos

Cultivo celular

- Se cultivaron los queratinocitos epidérmicos primarios neonatales de humano (Hekn, Cascade, Invitrogen, Carlsbad, California, EE.UU.) en el medio EpiLife con complementos de crecimiento HKGS (Cascade). Las células se mantuvieron constantemente en subconfluencia para evitar que se desencadenara un procedimiento de diferenciación. Las células recibieron un pase normalmente una vez a la semana, y en cada pase se anotó el número de células recogidas y el número de células inoculadas para calcular las duplicaciones de población que se producen entre los pases y el tiempo de generación de la población. En el pase 2 se sembraron 300.000 queratinocitos en placas de 60 mm. El día después, las células se trataron con los compuestos a la concentración indicada durante 48 horas sin cambiar de medio. Las células se recogieron mediante el raspado del medio. Las células se centrifugaron a 800 g durante 5 min y se extrajo el ARN.

Extracción del ARN y análisis por PCR en tiempo real

- El ARN total de las células o del tejido se aisló con el kit de aislamiento de microARN mirVana (Ambion) siguiendo el protocolo del fabricante para la extracción del ARN total. El ARN total se cuantificó en un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, Delaware, EE.UU.) y la calidad del ARN se controló en un gel de agarosa. Para la detección del microARN, el ARN se retrotranscribió con el kit de retrotranscripción de microARN TaqMan y se realizó la qRT-PCR con una mezcla madre universal para TaqMan (Applied Biosystem) y los cebadores específicos para los miR 130a, 138, 181a y 191. Se utilizó U18 como control interno (Applied Biosystem). La expresión de cada gen y miR se definió a partir del ciclo umbral (Ct) y se calculó el nivel de expresión relativa con el procedimiento $2^{-\Delta\Delta Ct}$ después de la normalización por referencia a la expresión del gen de mantenimiento U18.

45

Los compuestos siguientes se analizaron de acuerdo con el procedimiento de la invención, y se obtuvieron los siguientes resultados:

	miR-130a	miR-138	miR-181a	miR-191
Gingerol 6	> 20 (37%) (6. 10-5%)		> 20 (29%) (6. 10-5%)	> 20 (24%) (6. 10-5%)
ReversAge®		>20 (22%) (2,5. 10-6%)		
Éster metílico de triacetilleucodopacromo	20 (10-3%)			
Resveratrol	> 20 (25%) (4. 10-4%)		> 20 (21%) (4. 10-4%)	

Ejemplo 9: composición cosmética (suero O/W)

- 5 El experto en la técnica puede preparar la composición siguiente de una manera clásica.

Nombre INCI	% (p/p)
Agua	csp 100,00
Quelante	0,05
Equilibrio del pH	0,05
Conservantes	0,05
Glycol	3,25
Ammonium acryloyldimethyltaurate/VP copolymer	1,20
Acrilates/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer	0,20
Glycerin	3,00
Glycerylpolymermethacrylate	4,18
Sodium acetylated hyaluronate	0,05
Aceite	10,00
Alcohol	8,00
Perfumes	0,30
Resveratrol	0,05

Bibliografia

- Serrano et al (1997), Cell 88:593-562
- Campisi (2001), Trends Cell Biol 11:S27-S31
- Schmitt et al (2002) Cell 109:335-346
- Narita et al (2003), Cell 113:703-706
- Sharpless et al (2004) J Clin Invest 113:160-168
- Campisi (2005) Cell 120:513-522
- Yang et al (1999), Nature 398: 714-718
- Mills et al (1999), Nature 398 : 708-713
- Lena et al (2008), Cell Death Differ 15:1187
- Yi et al (2008), Nature 452:225
- Bernstein et al (2003), Nature Genetics 35:215-217
- Keyers et al (2005), Genes and Dev 19:1986-1999
- Mudhasani et al (2008), J Cell Biol 181:1055-1063
- Sommer et al (2006), Cell Cycle 5:2005-2011
- Kohrt DM et al (2009), Cell Cycle 8:2837-43
- Grossel MJ et al (2006) J Cell Biochem 97(3):485-93.

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> CHANNEL	
	<120> Cribado de micro-ARN (inhibición)	
5	<130> BFF100142	
	<160> 16	
10	<170> PatentIn versión 3.5	
	<210> 1	
	<211> 89	
	<212> ARN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> MicroARN	
20	<400> 1	
	ugcugcuggc cagagcucuu uucacauugu gcuacugucu gcaccuguca cuagcagugc	60
	aauguuaaaa gggcauuggc cguguagug	89
	<210> 2	
25	<211> 99	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
30	<223> MicroARN	
	<400> 2	
	cccuggcaug gugugguggg gcagcuggug uugugaauca ggccguugcc aaucagagaa	60
	cggcuacuuc acaacaccag ggccacacca cacuacagg	99
35	<210> 3	
	<211> 110	
	<212> ARN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> MicroARN	
	<400> 3	
45	ugaguuuuga gguugcuuca gugaacauuc aacgcugucg gugaguugg aauiuuuuc	60
	aaaaccaucg accguugauu guaccucaug gcuaaccauc aucuacucca	110
	<210> 4	
	<211> 92	
50	<212> ARN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> MicroARN	
55	<400> 4	
	cggcuggaca gcgggcaacg gaaucacaaa agcagcuguu gucuccagag cauuccagcu	60

gcgcuggau uucgucccu gcucuccugc cu

92

<210> 5
 <211> 31
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador
 10 <400> 5

 ggccactagt gcctacat gtgagctctt c 31

 15 <210> 6
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> cebador

 <400> 6
 25 ggccactagt gcatgtcctg gcaaacaaaa agag 34

 <210> 7
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> cebador

 <400> 7
 35 ttaaataaaa gaaaattgag tattgacat ttttaatt 39

 <210> 8
 <211> 39
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador

 45 <400> 8
 aattaaataa tggtaatac tcaattttct ttcatttaa 39

 <210> 9
 <211> 24
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> cebador
 55
 <400> 9
 gaccctagga gatgatcaag aggc 24

 <210> 10
 60 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 65 <223> cebador

	<400> 10 gcctaggaag ctgtacaaat tgct	24
5	<210> 11 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 11 gcaggtacag gaattgtcc ttaggaactt tagcatgct	39
15	<210> 12 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220> <223> cebador	
25	<400> 12 gacatgctaa agttcctaag gaacaattcc tgtacctgc	39
30	<210> 13 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> cebador	
	<400> 13 gaccctagga gatgatcaag aggc	24
40	<210> 14 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> cebador	
	<400> 14 gcctaggaag ctgtacaaat tgct	24
50	<210> 15 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
55	<220> <223> cebador	
	<400> 15 ggaactttag catgtcaaaa ttactgtga actcgataga	40
60	<210> 16 <211> 40 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
65	<220> <223> cebador	

ES 2 526 897 T3

<400> 16

tctatcgagt tcacaagtaa tttgacatg ctaaagtcc

40

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* para el cribado de compuestos candidatos para la prevención y/o atenuación del envejecimiento de la piel, y/o para la hidratación de la piel, que comprende las etapas siguientes:
 - a. poner en contacto al menos un compuesto problema con una muestra de queratinocitos;
- 5 b. medir la expresión o la actividad de al menos el microARN 138 en dichos queratinocitos;
 - c. seleccionar los compuestos en los que se mide una inhibición de la expresión de al menos el 20%, preferiblemente de al menos el 30%, preferiblemente de al menos el 40%, o una inhibición de la actividad de al menos el 20%, preferiblemente de al menos el 30%, preferiblemente de al menos el 40%, de dicho microARN en los queratinocitos tratados en (a) en comparación con los queratinocitos sin tratar.
- 10 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que la etapa (b) se realiza antes y después de la etapa (a).
3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:
 - a'. preparar al menos dos muestras de queratinocitos;
 - a. poner en contacto una de las muestras con al menos un compuesto problema; luego
- 15 b. medir la expresión o la actividad de al menos el microARN 138 en dichas muestras; y
 - c. seleccionar los compuestos en los que se mide una inhibición de la expresión de al menos el 20%, preferiblemente de al menos el 30%, preferiblemente de al menos el 40%, o una inhibición de la actividad de al menos el 20%, preferiblemente de al menos el 30%, preferiblemente de al menos el 40%, de dicho microARN en los queratinocitos tratados en (a) en comparación con la muestra de queratinocitos sin tratar.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dichos queratinocitos son queratinocitos presenescentes.
5. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el microARN actúa selectivamente sobre el ARNm de p63 o sobre el gen TP63.
6. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, caracterizado por que los queratinocitos presenescentes se obtienen después de las 37 duplicaciones de la población en las condiciones clásicas de cultivo.
- 25 7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizado por que las condiciones clásicas de cultivo comprenden un cultivo de los queratinocitos en el medio 154 con complementos de crecimiento HKGS, y se mantiene constantemente en un estado de subconfluencia.
- 30 8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que los compuestos problema se eligen de extractos botánicos.
9. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que la inhibición de la expresión o la actividad del microARN medida en la etapa (c) es de al menos el 50%, preferiblemente de al menos el 60%.
- 35 10. Uso cosmético de un anti-miR-138, para la prevención y/o atenuación del envejecimiento de la piel y/o para la hidratación de la piel.

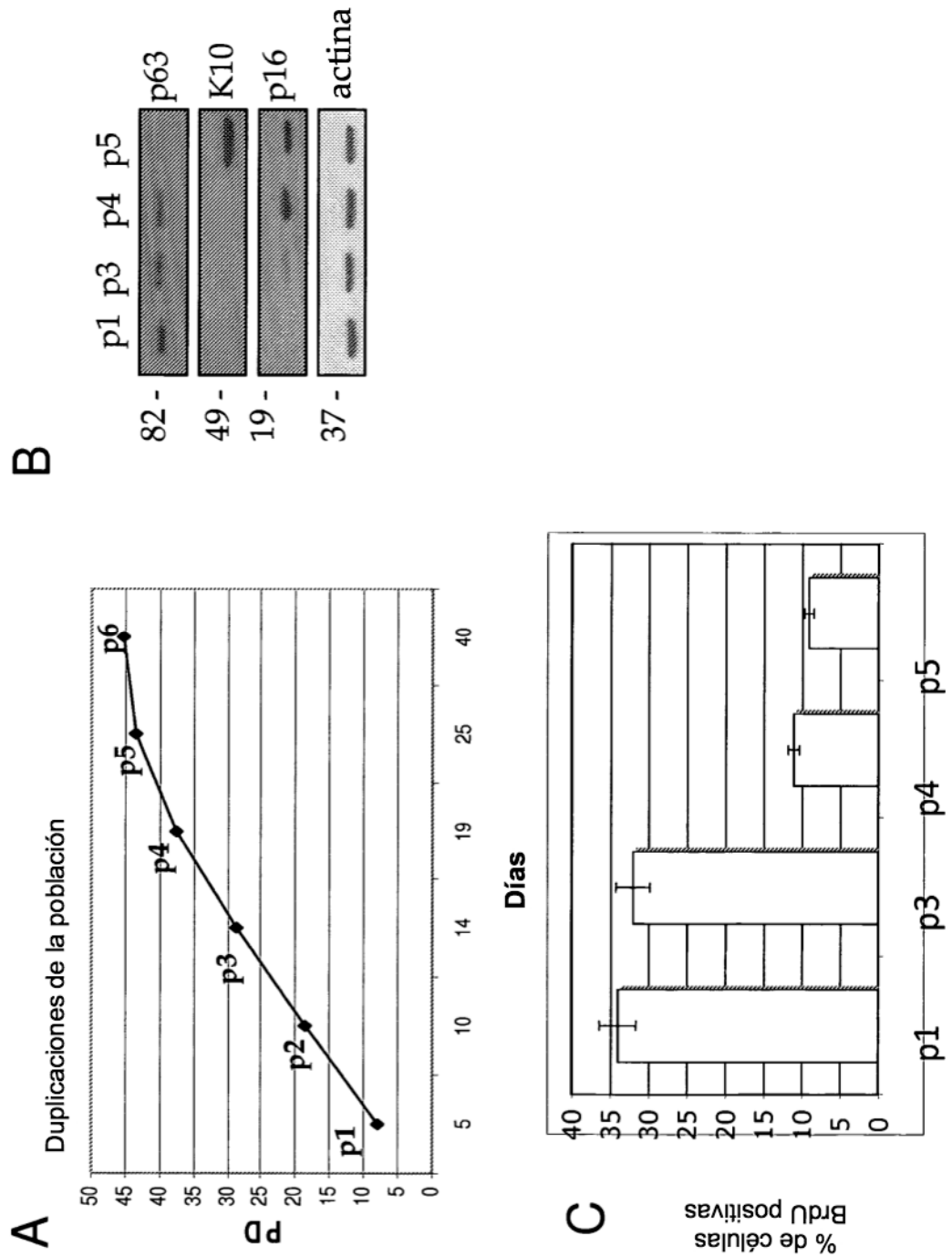
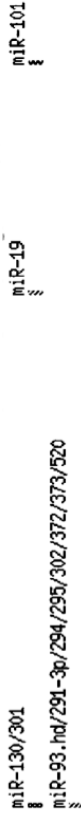


Figura 1

A

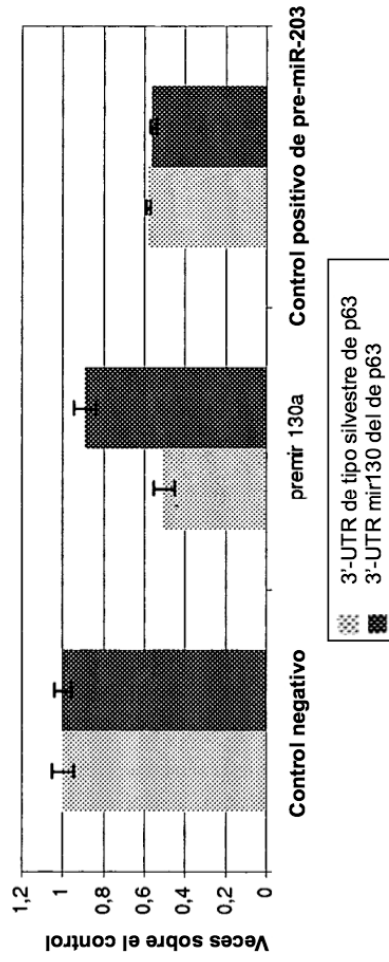
3'-UTR de p63

Sitios conservados para las familias de miARN conservadas en humano, ratón, rata, perro y pollo



B

3'-UTR de p63



C

desordenada miR-130a

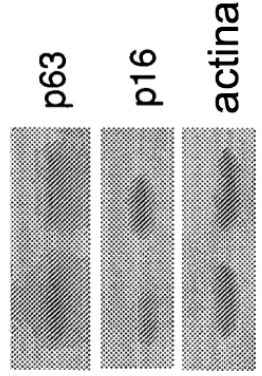


Figura 2

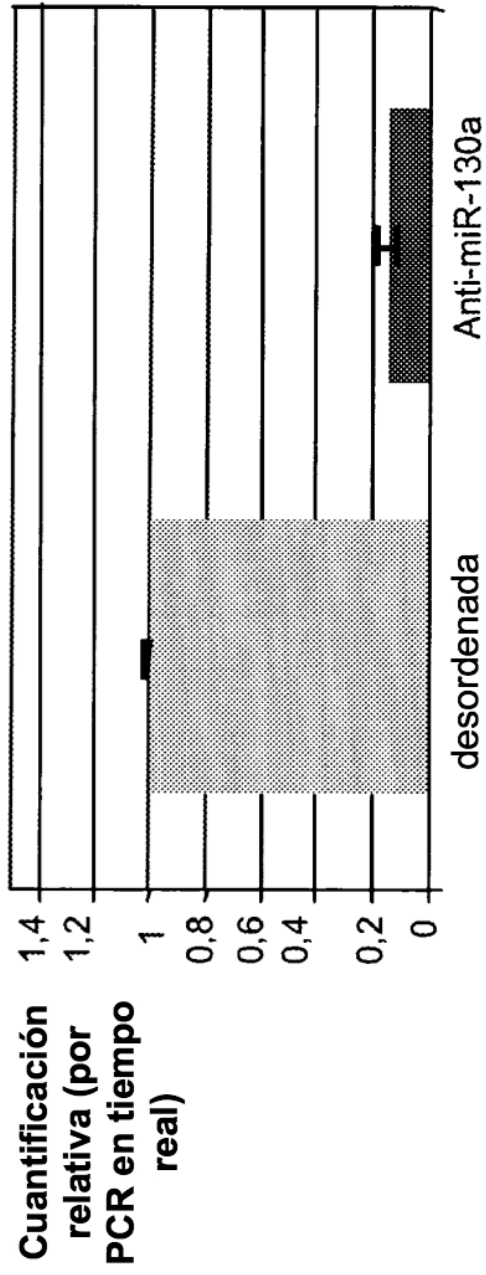
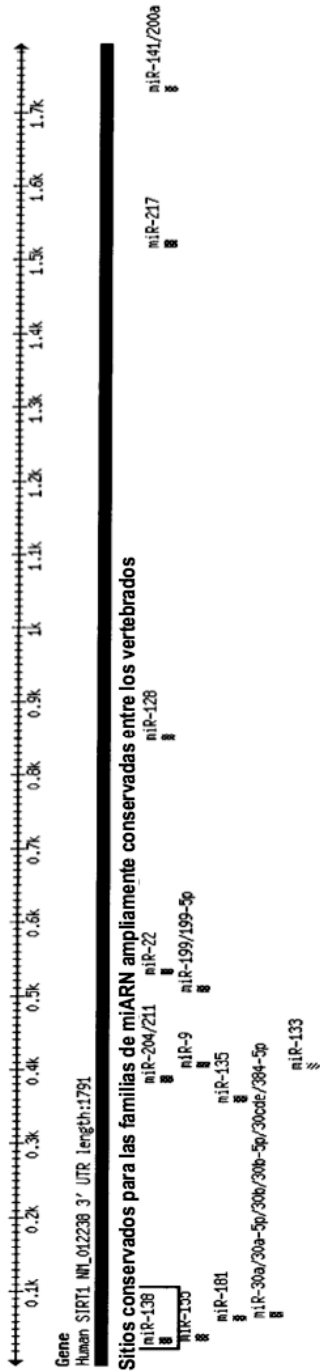


Figura 3

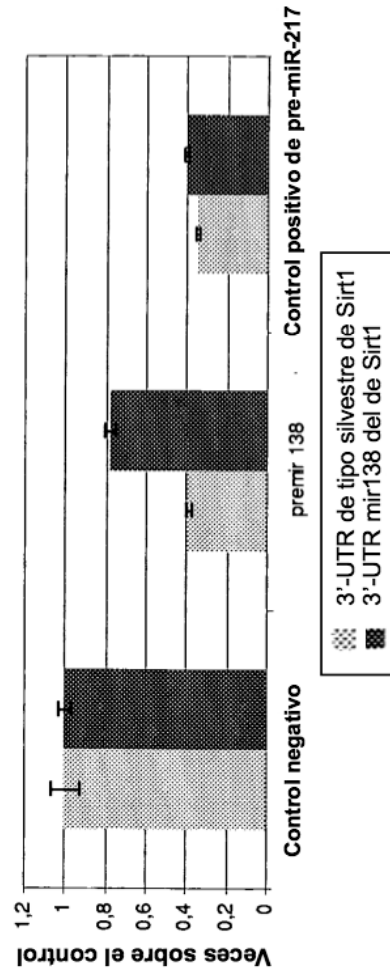
A

3'-UTR de Sirt-1



B

3'-UTR de Sirt-1



C

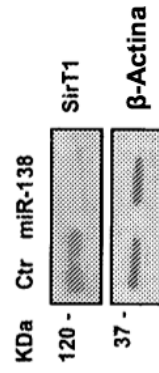


Figura 4

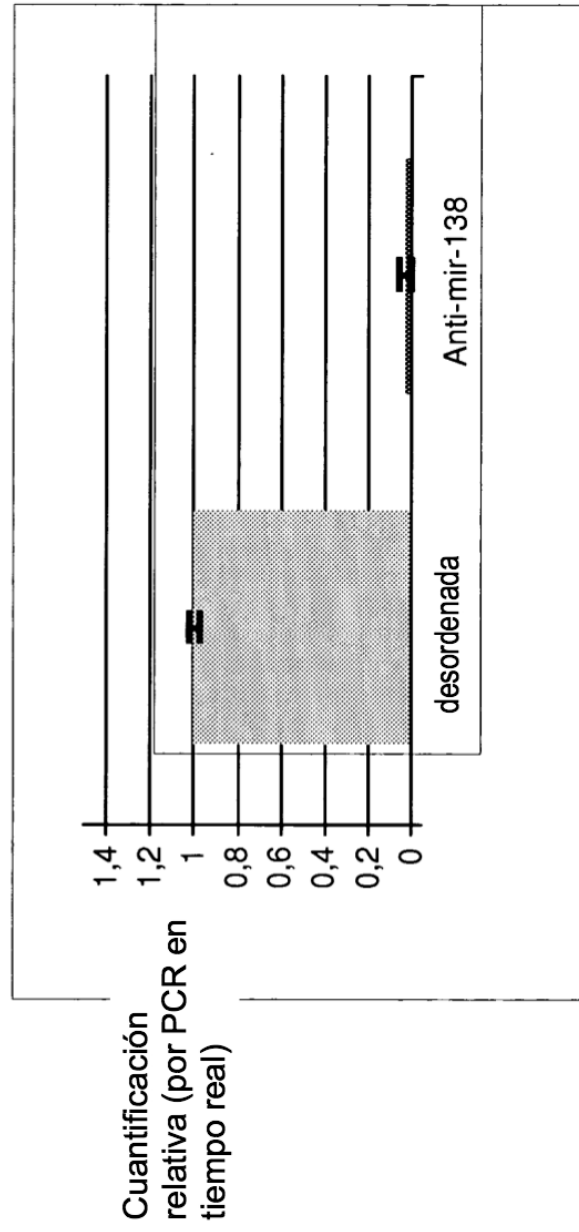
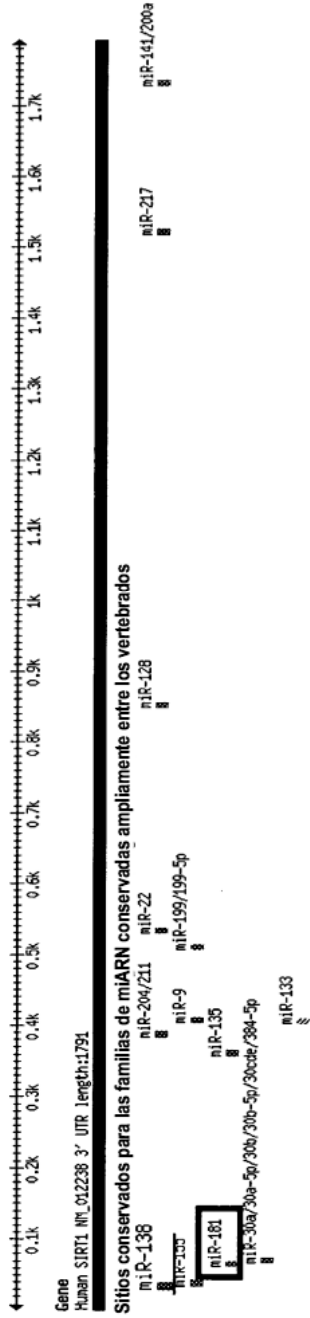
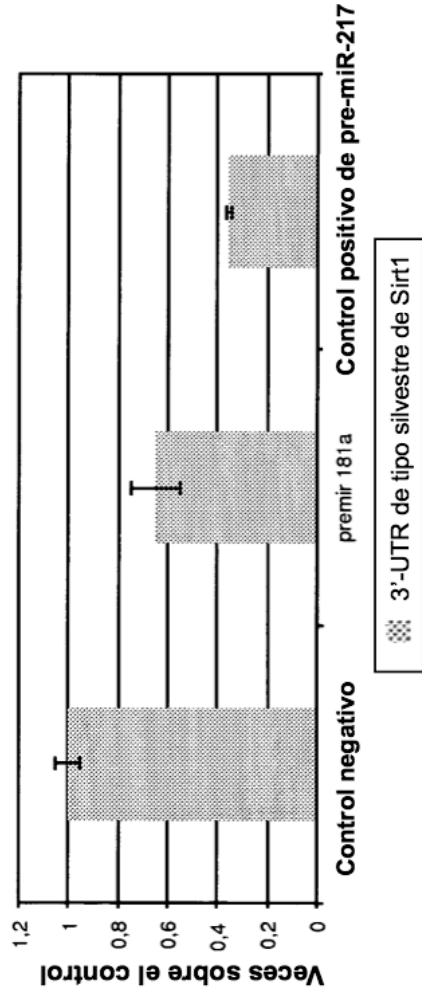


Figura 5

A 3'-UTR de Sirt-1



B 3'-UTR de Sirt-1



C

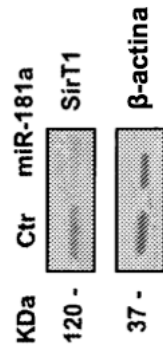


Figura 6

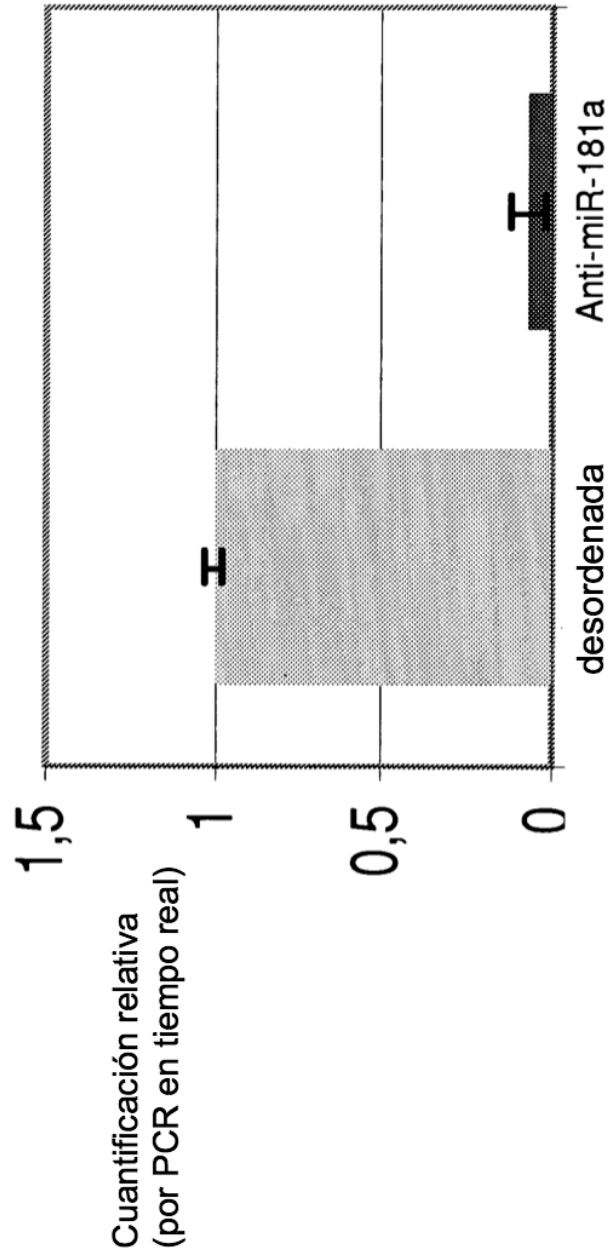


Figura 7

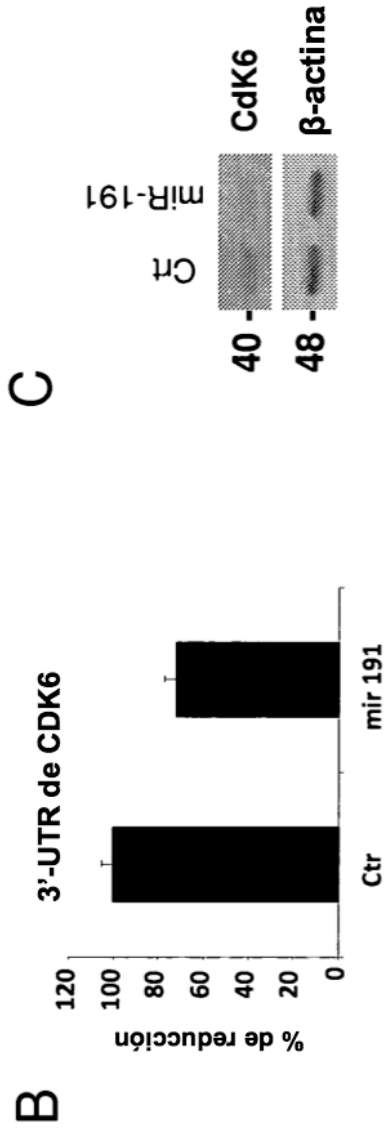
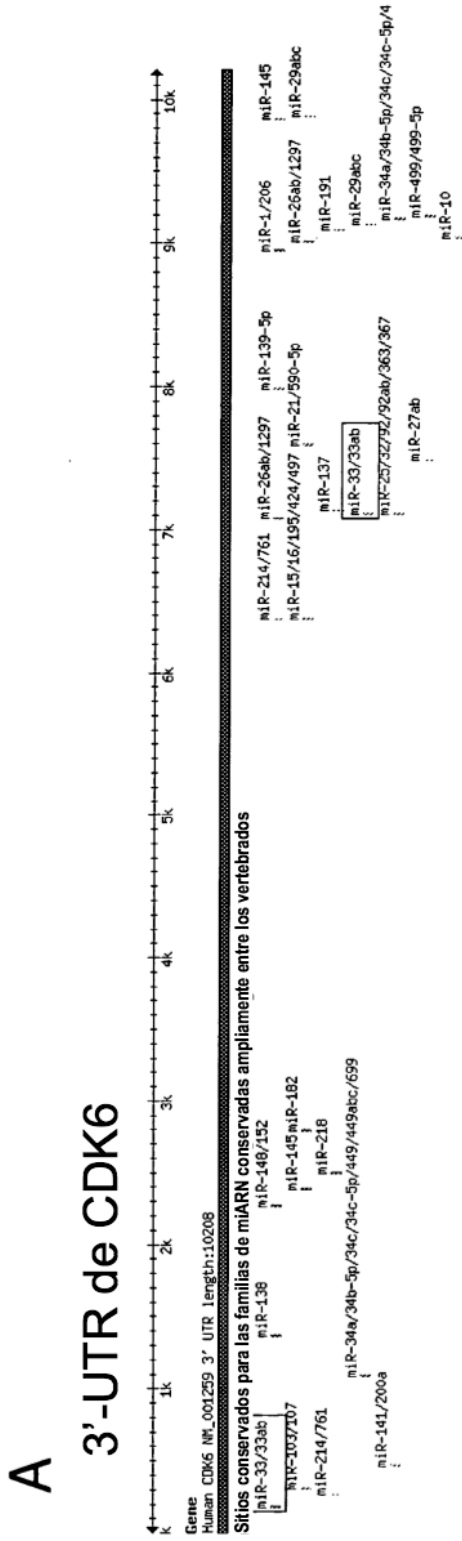


Figura 8

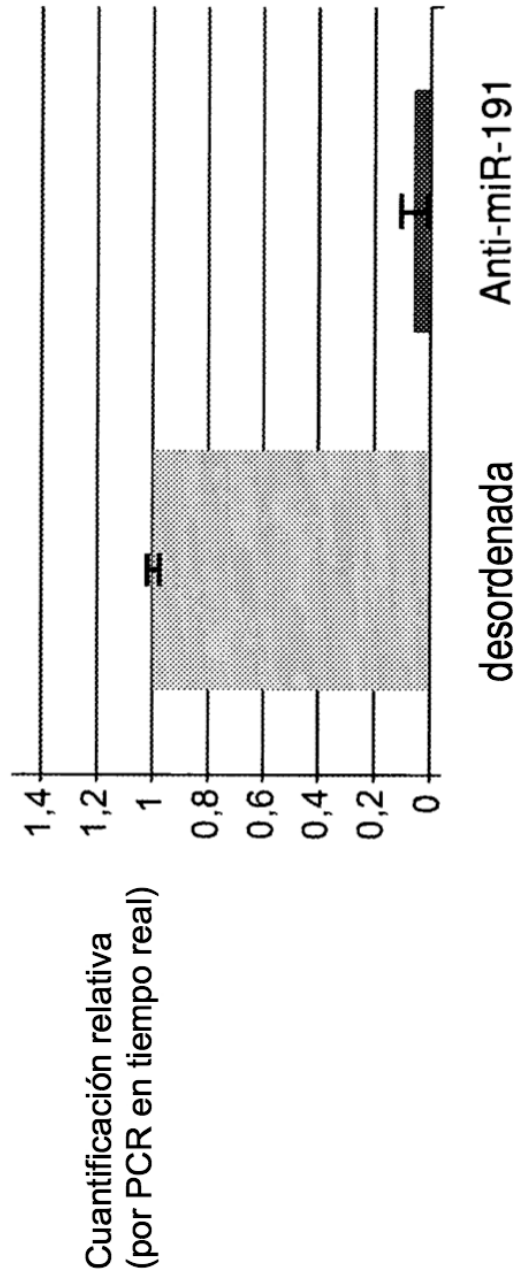


Figura 9

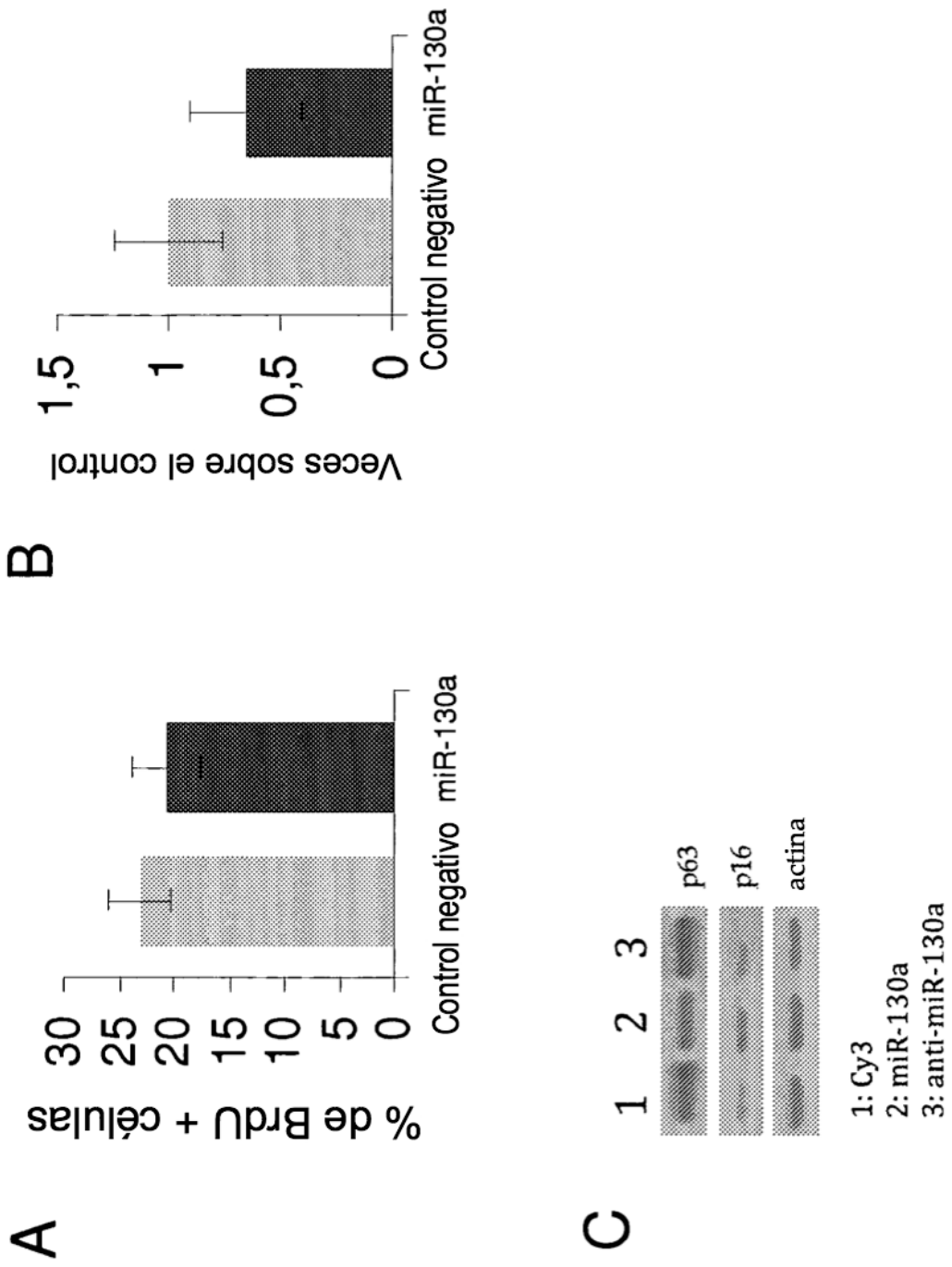
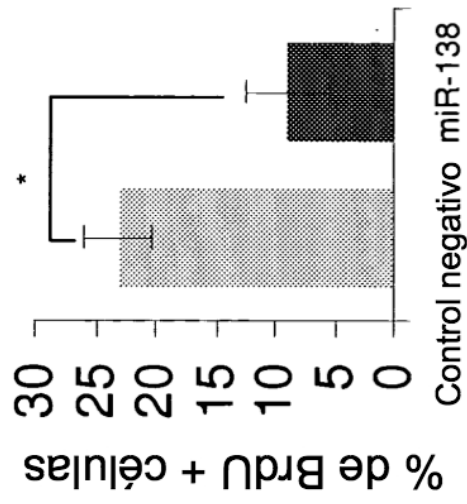


Figura 10

A



B

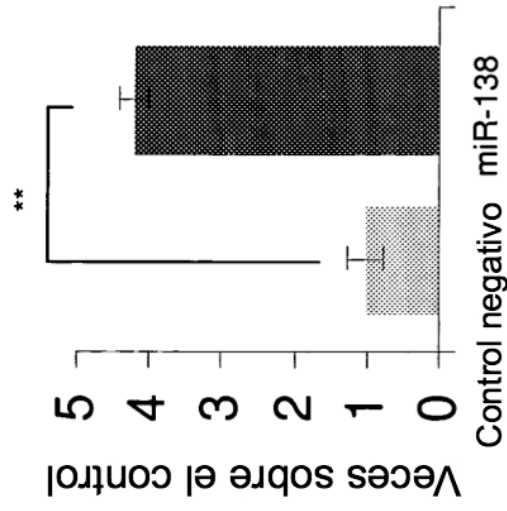


Figura 11

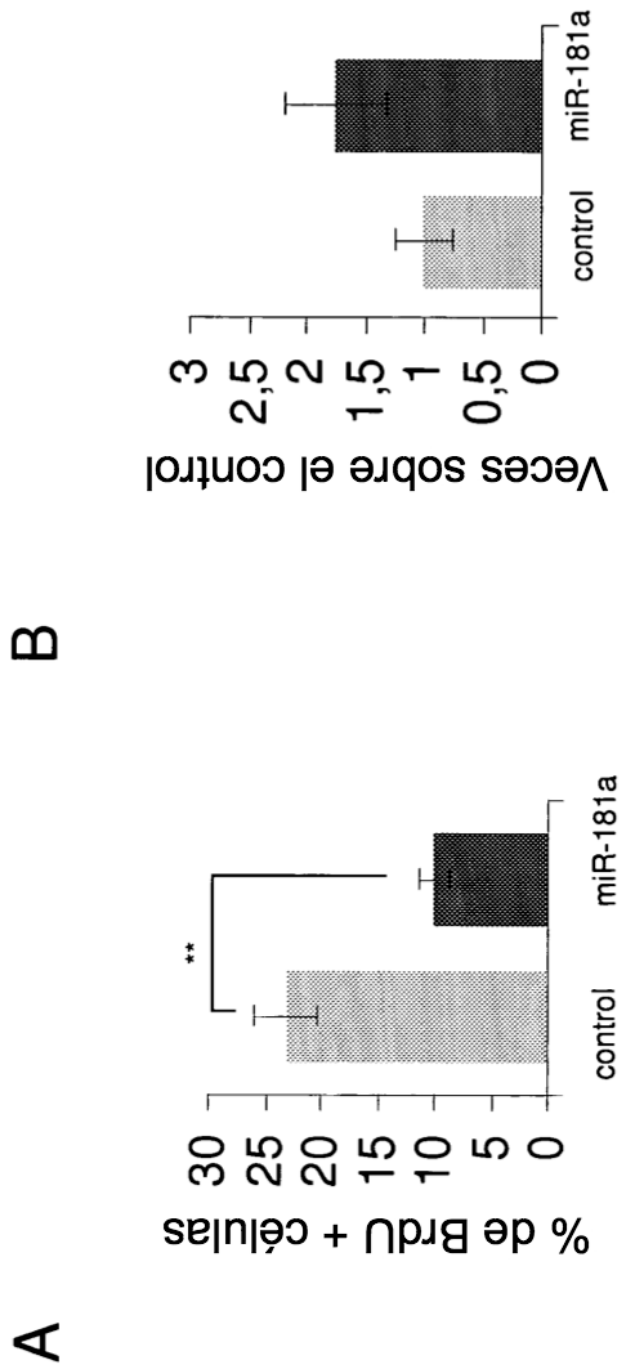


Figura 12

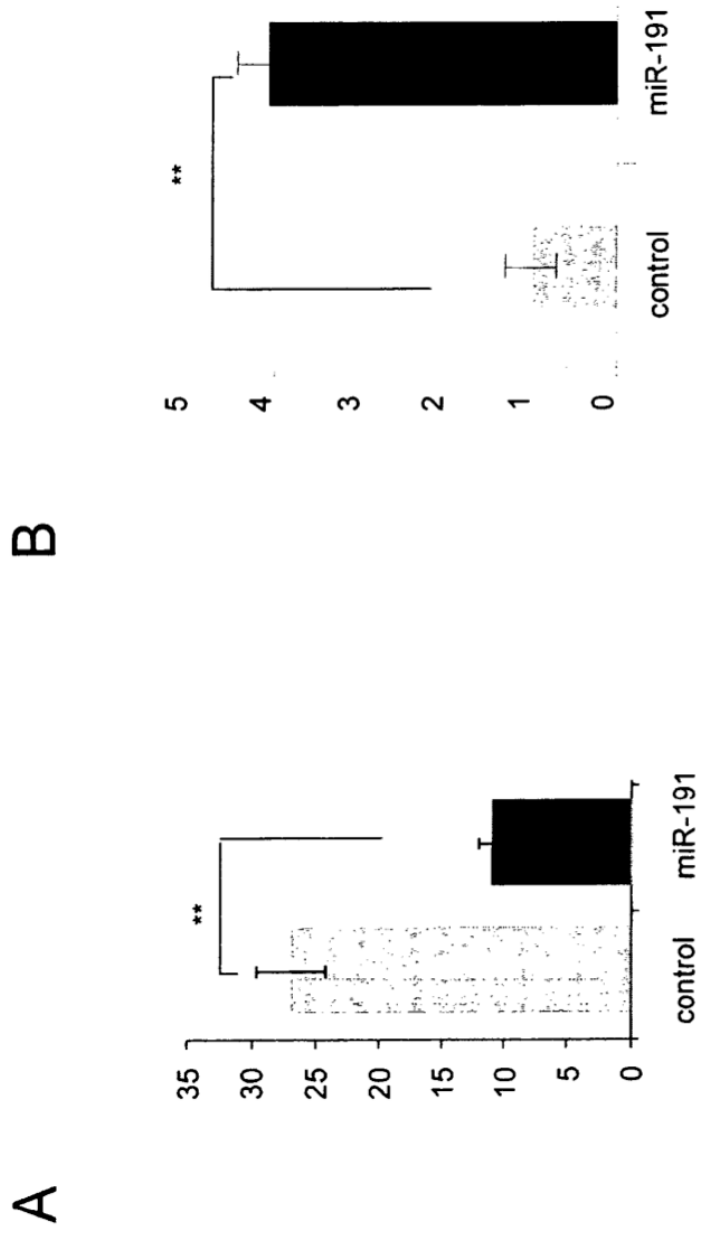


Figura 13

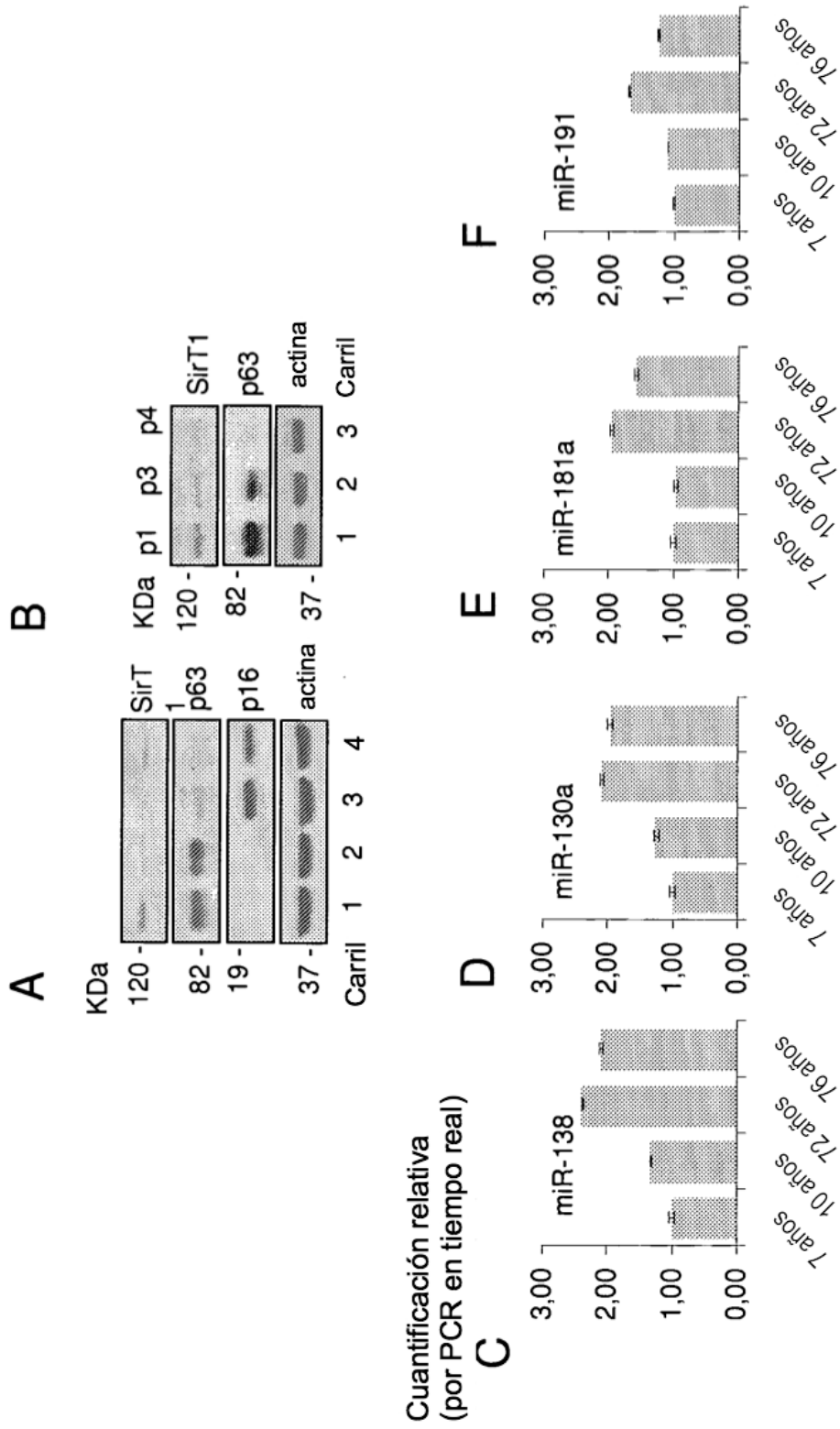


Figura 14