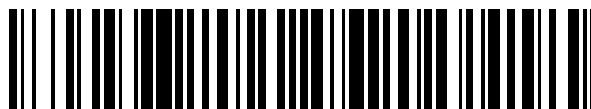


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 212**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2012** **PCT/IB2012/053971**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013** **WO13018060**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2012** **E 12759827 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017** **EP 2739736**

54 Título: **miR-135 y composiciones que lo comprenden para el tratamiento de afecciones médicas asociadas con la serotonina**

30 Prioridad:

04.08.2011 US 201161514954 P

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

11.09.2017

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
(100.0%)**

**At the Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95
7610002 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**CHEN, ALON;
HORNSTEIN, ERAN;
ISSLER, ORNA;
HARAMATI, SHARON y
VOLK, NAAMA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 632 212 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

miR-135 y composiciones que lo comprenden para el tratamiento de afecciones médicas asociadas con la serotonina

Campo y antecedentes de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a microARN y, más concretamente, pero no exclusivamente, al uso de los mismos para el diagnóstico, el tratamiento y el tratamiento de control de enfermedades.

Los trastornos del estado de ánimo, tales como la depresión mayor, representan algunos de los problemas de salud más comunes y proliferantes que afectan a aproximadamente el 10 % de la población mundial. A pesar de muchas décadas de investigación, los mecanismos que hay tras la aparición de la depresión, la susceptibilidad y las terapias disponibles solo se entienden parcialmente. En la actualidad, solo aproximadamente un tercio de los pacientes responden a los tratamientos disponibles, por lo tanto, existe la gran necesidad de comprender mejor la patología. El dogma actual con respecto a la etiología de la depresión es de una compleja interacción entre los factores ambientales y la predisposición genética, lo que sugiere un papel mecanicista para los procesos epigenéticos.

La serotonina (5HT) es un neurotransmisor de monoamina producido en el cerebro por el núcleo del rafe (RN), que se proyecta extensamente a través del cerebro para modular una variedad de funciones cognitivas, emocionales y fisiológicas. El vínculo entre la actividad serotoninérgica desregulada y la depresión está bien establecido [Michelsen KA. *et al.*, *Brain Res Rev* (2007) 55(2):329-42]. Los niveles de 5HT, así como los circuitos genéticos a cargo de su producción, secreción, recaptación y desactivación, están desregulados en la depresión. Además, la mayoría de los fármacos antidepresivos de los que se dispone en la actualidad se dirigen a la función de las proteínas relacionadas con el sistema 5HT, lo que produce un aumento de los niveles de 5HT en la sinapsis [Krishnan V y Nestler E. J., *Nature* (2008) 455: 894-902]. La terapéutica disponible requiere un largo período de administración antes de observarse el alivio de los síntomas.

Los microARN (miR) son un subconjunto de moléculas de ARN pequeñas endógenas (aproximadamente 22 nucleótidos) que reprimen la expresión génica después de la transcripción. Los miR se transcriben como moléculas primarias de miR que se procesan en el núcleo de la célula en miR precursores con estructuras de bucle de tallo, que se exportan al citoplasma donde se procesan además en los miR maduros activos. El miR maduro se incorpora posteriormente al complejo de silenciamiento inducido por ARN y funciona principalmente mediante la unión a las regiones 3' no traducidas (3'UTR) de moléculas de ARNm específicas. La unión se produce a través de la secuencia de base, una secuencia de 6 a 8 nucleótidos en el extremo 5' del miR, uniéndose la base a una secuencia de coincidencia de base complementaria en la 3'UTR de ARNm diana. La unión de un miR conduce a la desestabilización directa o a la represión de la traducción del ARNm, produciendo en última instancia niveles reducidos de proteína del gen diana.

Los miR son abundantes en el sistema nervioso, y la investigación inicial se ha centrado principalmente en las neuronas en el contexto del desarrollo del cáncer y de los trastornos neurodegenerativos y en el proceso normal, tal como la plasticidad [Kosik K. S. *Nat Rev Neurosci* (2006) 7:911-20]. Además, se ha sugerido que los miR desempeñan un papel en los trastornos psiquiátricos tales como la esquizofrenia, el autismo y también la depresión y la ansiedad, tanto en seres humanos como en modelos de ratón [Miller B. H. y Wahlestedt C., *Brain Res* (2010) 1338: 89-99]. Varios estudios han demostrado recientemente la participación de los miR en la regulación genes relacionados con la 5HT [Millan M. J. *Curr Opin Pharmacol* (2011) 11(1):11-22] revelando el papel emergente de los miR en la regulación del sistema 5HT y su posible asociación con trastornos relacionados con la depresión.

En A. Baudry *et al.*: "MiR-16 targets the serotonin transporter: a new facet for adaptive responses to antidepressants", *Science* 2010, vol. 329, páginas 1537-1541, y A. Holleman *et al.*: "miRNA-135a contributes to paclitaxel resistance in tumor cells both in vitro and in vivo", *Oncogene* 2011, vol. 30, páginas 4386-4398, se describe la implicación de determinados miR en ciertas afecciones médicas.

La solicitud de patente de EE.UU. n.º 20100222413 (concedida a Stoffel M. *et al.*) desvela oligonucleótidos modificados químicamente para modular la expresión de microARN. El documento US 20100222413 desvela además métodos de silenciamiento de los microARN (por ejemplo, miR-122, miR-16, miR-192 y miR-194) para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central.

Sumario de la invención

La presente invención se dirige al la materia objeto como se define en las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a un miR-135, un precursor del mismo o un polinucleótido exógeno que codifica dicho miR-135 o dicho precursor del mismo, para su uso en el tratamiento de una afección médica en la que un aumento del nivel de serotonina es terapéuticamente beneficioso.

Preferentemente, dicho polinucleótido exógeno que codifica dicho miR-135 o dicho precursor del mismo está comprendido en una construcción de ácido nucleico, estando dicho polinucleótido bajo un control de la transcripción de un elemento regulador que actúa en *cis*. En una realización preferida, dicho elemento regulador que actúa en *cis* es activo en una célula neuroglial.

El miR-135 para el uso de la presente invención es preferentemente como se expone en SEQ ID NO: 58-62.

La presente invención también se dirige a un miR-135 para el uso de la presente invención, en el que dicho miR-135 comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en una cadena principal modificada, un enlace internucleosídico modificado y una base modificada. Dicha cadena principal modificada comprende preferentemente una modificación seleccionada del grupo que consiste en un fosforotioato, un fosforotioato quiral, un fosforoditioato, un fosfotriéster, un aminoalquilfosfotriéster, un metilfosfonato, un alquilfosfonato, un fosfonato quiral, un fosfinato, un fosforamidato, un aminoalquilfosforamidato, un tionofosforamidato, un tionoalquilfosfonato, un tionoalquilfosfotriéster, un boranofosfato, un fosfodiéster, un ácido peptidonucleico(PNA) y un 2'-O-metoxietilo.

El miR-135 para el uso de la presente invención comprende opcionalmente una modificación tanto en un azúcar como en un enlace internucleosídico.

La presente invención también se dirige a un miR-135 para el uso de la presente invención, en la que dicha afección médica se selecciona del grupo que consiste en una depresión, una ansiedad, un estrés, una fatiga, una función cognitiva deteriorada, un ataque de pánico, un comportamiento compulsivo, una adicción, una fobia social, un trastorno del sueño, un trastorno relacionado con la alimentación, un trastorno del crecimiento y un trastorno de la reproducción. Dicha afección médica puede ser un trastorno del estado de ánimo.

La presente invención se dirige además a una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un miR-135 o un precursor del mismo, estando dicha secuencia de ácido nucleico bajo un control de la transcripción de un elemento regulador que actúa en *cis* activo en una célula neuroglial.

En un aspecto adicional, la presente invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende la construcción de ácido nucleico de la invención y a un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida de la composición farmacéutica de la reivindicación de invención, dicho miR-135 es como se establece en SEQ ID NO: 58-62. Opcionalmente, dicho miR-135 comprende una modificación tanto en un enlace de azúcar como en un enlace internucleosídico.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método de tratamiento de una afección médica en la que una elevación de nivel de serotonina es terapéuticamente beneficioso en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar a o expresar en una célula del sujeto un polinucleótido exógeno que codifica al menos un microARN o un precursor del mismo, en el que el microARN se selecciona del grupo que consiste en miR-135, miR-335, miR-26 y miR-182, tratando de este modo la afección médica.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un uso de un polinucleótido exógeno que codifica al menos un microARN o un precursor del mismo, en el que el microARN se selecciona del grupo que consiste en miR-135, miR-335, miR-26 y miR-182, para la fabricación de un medicamento identificado para el tratamiento de una afección médica en la que una elevación del nivel de serotonina es terapéuticamente beneficiosa.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método de aumento del nivel de serotonina en una hendidura sináptica de un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar a o expresar en una neurona serotonérgica del sujeto un polinucleótido exógeno que codifica al menos un microARN o un precursor del mismo, en el que el microARN se selecciona del grupo que consiste en miR-135, miR-335, miR-26 y miR-182, aumentando así el nivel de serotonina en la hendidura sináptica.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona una célula neuroglial aislada que comprende una construcción de ácido nucleico que expresa al menos un microARN o un precursor del mismo, en la que el microARN se selecciona del grupo que consiste en miR-135, miR-335, miR-26 y miR-182 bajo un control de la transcripción de un elemento regulador que actúa en *cis*.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica al menos un microARN o un precursor del mismo, en el que el microARN se selecciona del grupo que consiste en miR-135, miR-335, miR-26 y miR-182, para el tratamiento de una afección médica en la que una elevación del nivel de serotonina es terapéuticamente beneficiosa.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método de tratamiento de una afección médica en la que un nivel bajo de adrenalina o noradrenalina es terapéuticamente beneficioso en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar a o expresar en una célula del sujeto

un polinucleótido exógeno que codifica miR-19, o un precursor del mismo, tratando de este modo la afección médica.

5 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un uso de un polinucleótido exógeno que codifica un miR-19, o un precursor del mismo, para la fabricación de un medicamento identificado para el tratamiento de una afección médica en la que un nivel bajo de adrenalina o noradrenalina es terapéuticamente beneficioso.

10 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona una célula aislada que comprende una construcción de ácido nucleico que expresa un miR-19 o un precursor del mismo bajo un control de la transcripción de un elemento regulador que actúa en *cis*.

15 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un uso de un polinucleótido aislado que codifica un miR-19, o un precursor del mismo, para el tratamiento de una afección médica en la que un nivel bajo de adrenalina o noradrenalina es terapéuticamente beneficioso.

20 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método de tratamiento de una afección médica en la que un nivel bajo de hormona liberadora de corticotropina (CRH) es terapéuticamente beneficioso en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar a o expresar en una célula del sujeto un polinucleótido exógeno que codifica miR-15, o un precursor del mismo, tratando de este modo la afección médica.

25 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un uso de un polinucleótido exógeno que codifica un miR-15, o un precursor del mismo, para la fabricación de un medicamento identificado para el tratamiento de una afección médica en la que un nivel bajo de hormona liberadora de corticotropina (CRH) es terapéuticamente beneficioso.

30 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona una célula aislada que comprende una construcción de ácido nucleico que expresa un miR-15 o un precursor del mismo bajo un control de la transcripción de un elemento regulador que actúa en *cis*.

35 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica un miR-15, o un precursor del mismo, para el tratamiento de una afección médica en la que un nivel bajo de hormona liberadora de corticotropina (CRH) es terapéuticamente beneficioso.

40 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método de tratamiento de una afección médica en la que un nivel bajo de receptor de glutamato es terapéuticamente beneficioso en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar a o expresar en una célula del sujeto un polinucleótido exógeno que codifica miR-181, o un precursor del mismo, tratando de este modo la afección médica.

45 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un uso de un polinucleótido exógeno que codifica un miR-181, o un precursor del mismo, para la fabricación de un medicamento identificado para el tratamiento de una afección médica en la que un nivel bajo de receptor de glutamato es terapéuticamente beneficioso.

50 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona una célula aislada que comprende una construcción de ácido nucleico que expresa un miR-181 o un precursor del mismo bajo un control de la transcripción de un elemento regulador que actúa en *cis*.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica un miR-181, o un precursor del mismo, para el tratamiento de una afección médica en la que un nivel bajo de receptor de glutamato es terapéuticamente beneficioso.

55 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un microARN o un precursor del mismo, en la que el microARN o un precursor del mismo se selecciona del grupo que consiste en miR-135, miR-335, miR-26, miR-27, miR-181, miR-182, miR-19 y miR-15, estando la secuencia de ácido nucleico bajo un control de la transcripción de un elemento regulador que actúa en *cis*.

60 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona una composición farmacéutica que comprende la construcción de ácido nucleico de la presente divulgación y a un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

65 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen de triptófano hidroxilasa 2 (Tph2) en una célula neuroglial, comprendiendo el

método la modulación de una actividad o expresión de un microARN o un precursor del mismo en la célula neuroglial, en la que el microARN se selecciona del grupo que consiste en miR-181 y miR27, regulando de este modo la expresión del gen Tph2.

5 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen receptor de glutamato en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un miR-181 o un precursor del mismo en la célula neuroglial, regulándose así la expresión del gen del receptor de glutamato.

10 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico para regular por disminución una expresión de un miR-181, miR-27 o un precursor de los mismos.

15 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico para la regulación por disminución de una expresión de un microARN o un precursor del mismo, en la que el microARN o un precursor del mismo se selecciona del grupo que consiste en miR-181 y miR-27, estando la secuencia de ácido nucleico bajo un control de la transcripción de un elemento regulador que actúa en *cis*.

20 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen de transportador de serotonina (Slc6a4) en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un microARN o un precursor del mismo en la célula neuroglial, en el que el microARN se selecciona del grupo que consiste en miR-135 y miR-335, regulando de este modo la expresión del gen Slc6a4.

25 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen de receptor inhibidor de la serotonina 1a (Htr1a) en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un microARN o un precursor del mismo en la célula neuroglial, en el que el microARN se selecciona del grupo que consiste en miR-135 y miR-335, miR-181, miR-182 y miR-26, regulando de este modo la expresión del gen Htr1a.

30 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen de la molécula de adhesión celular de síndrome de Down (Dscam) en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un miR-182 o un precursor del mismo en la célula neuroglial, regulando de este modo la expresión del gen Dscam.

35 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen de la molécula de adhesión celular L1 (L1cam) en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un miR-182 o un precursor del mismo en la célula neuroglial, regulando de este modo la expresión del gen L1cam.

40 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen de la proteína X asociada a Translin (Tsnax) en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un miR-182 o un precursor del mismo en la célula neuroglial, regulando de este modo la expresión del gen Tsnax.

45 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen de monoamina hidroxilasa (MaoA) en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un miR-27, regulando de este modo la expresión del gen MaoA.

50 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen del receptor beta adrenérgico 1 (Adrb1) en una célula neuroglial o célula cardíaca, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un miR-19, regulando de este modo la expresión del gen Adrb1.

55 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen del receptor canabinoide 1 (CB1) en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un miR-19 o un precursor del mismo en la célula neuroglial, regulando de este modo la expresión del gen CB1.

60 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen del receptor de CRH de tipo 1 en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un miR-15, regulando de este modo la expresión del gen del receptor de CRH de tipo 1.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen de la proteína de unión a FK506 5 (FKBP5) en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un miR-15 o un precursor del mismo en la célula neuroglial, regulando de este modo la expresión del gen FKBP5.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen de sintaxina 1a (Stx1a) en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un miR-15 o un precursor del mismo en la célula neuroglial, regulando de este modo la expresión del gen Stx1a.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen de quinasa regulada por suero/glucocorticoide (Sgk1) en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un miR-15 o un precursor del mismo en la célula neuroglial, regulando de este modo la expresión del gen Sgk1.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen de receptor beta 2 adrenérgico (Adrb2) en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un miR-15 o un precursor del mismo en la célula neuroglial, regulando de este modo la expresión del gen Adrb2.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método de control del tratamiento de un fármaco antidepresivo, comprendiendo el método: (a) tratar a un sujeto que lo necesita con un fármaco antidepresivo; y (b) medir un nivel de expresión de un miR-135 en la sangre del sujeto antes y después del tratamiento, en el que un nivel de expresión inferior del miR-135 después del tratamiento por el fármaco antidepresivo en comparación con el nivel de expresión del miR-135 antes del tratamiento con el fármaco antidepresivo es indicativo de la eficacia del tratamiento.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente divulgación, se proporciona un método de diagnóstico de una afección médica relacionada con la serotonina en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método la medición de un nivel de expresión de un miR-135 en una sangre del sujeto, en el que un alto nivel de expresión del miR-135 en comparación con el de una muestra de sangre de un sujeto sano es indicativo de la afección médica asociada con la serotonina.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, la célula es una célula neuroglial.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, la célula neuroglial es una neurona serotoninérgica.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el miR-135 es como se expone en SEQ ID NO: 58-62.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el miR-335 es como se expone en SEQ ID NO: 63-64.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el miR-26 es como se expone en SEQ ID NO: 65-69.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el miR-182 es como se expone en SEQ ID NO: 70-71.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, la afección médica se selecciona del grupo que consiste en una depresión, una ansiedad, un estrés, una fatiga, una función cognitiva deteriorada, un ataque de pánico, un comportamiento compulsivo, una adicción, una fobia social, un trastorno del sueño, un trastorno relacionado con la alimentación, un trastorno del crecimiento y un trastorno de la reproducción.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, cuando el microARN es miR-135, la afección médica es depresión o ansiedad.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, la célula es una célula neuroglial o una célula cardíaca.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el miR-19 es como se expone en SEQ ID NO: 72-76.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, la afección médica se selecciona del grupo que consiste en un estrés, una ansiedad, un deterioro de la memoria y una afección cardíaca.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el miR-15 es como se expone en SEQ ID NO: 77-80.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, la afección médica se selecciona del grupo que consiste en una depresión, una ansiedad, un estrés, una fatiga, una función cognitiva deteriorada, un ataque de pánico, un comportamiento compulsivo, una adicción, una fobia social, un trastorno del sueño, un trastorno relacionado con la alimentación, un trastorno del crecimiento y un trastorno de la reproducción.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el polinucleótido está bajo un control de la transcripción de un elemento regulador que actúa en *cis* en una célula neuroglial.

5 De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el polinucleótido que bajo un control de la transcripción de un elemento regulador que actúa en *cis* en una célula cardíaca.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el miR-181 es como se expone en SEQ ID NO: 85-94.

10 De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, la afección médica se selecciona del grupo que consiste en convulsiones, enfermedad de Huntington, esquizofrenia, síndrome de X frágil, trastorno de ansiedad generalizada y cáncer.

15 De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el elemento regulador que actúa en *cis* es activo en una célula neuroglial o una célula cardíaca.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el sujeto es un sujeto humano.

20 De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, cuando la regulación comprende la regulación por aumento de la expresión del gen Tph2, la modulación comprende la regulación por disminución del miR-181 y/o miR-27 en la célula neuroglial.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende además la medición de una expresión del gen Tph2 tras la regulación por disminución del miR-181 y/o miR-27 en la célula neuroglial.

25 De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el gen del receptor de glutamato se selecciona del grupo que consiste en receptor de glutamato metabotrópico 1 (Grm1), receptor de glutamato ionotrópico, kainato 3 (Grik3), receptor de glutamato metabotrópico 5 (Grm5), receptor de glutamato ionotrópico kainato 2 (Grik2) y receptor de glutamato metabotrópico 7 (Grm7).

30 De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, cuando la regulación comprende la regulación por disminución de la expresión del gen Slc6a4, la modulación comprende la regulación por aumento del miR-135 y/o miR-335 en la célula neuroglial.

35 De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende además la medición de una expresión del gen Slc6a4 tras la regulación por aumento del miR-135 y/o miR-335 en la célula neuroglial.

40 De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, cuando la regulación comprende la regulación por disminución de la expresión del gen Htr1a, la modulación comprende la regulación por aumento del miR-135, miR-335, miR-181, miR-182 y/o miR-26 en la célula neuroglial.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende además la medición de una expresión del gen Htr1a tras la regulación por aumento del miR-135, miR-335, miR-181, miR-182 y/o miR-26 en la célula neuroglial.

45 De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, cuando la regulación comprende la regulación por disminución de la expresión del gen MaoA, la modulación comprende la regulación por aumento del miR-27 en la célula neuroglial.

50 De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende además la medición de una expresión del gen MaoA tras la regulación por aumento del miR-27 en la célula neuroglial.

55 De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, cuando la regulación comprende la regulación por disminución de la expresión del gen Adrb1, la modulación comprende la regulación por aumento del miR-19 en la célula neuroglial o la célula cardíaca.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende además la medición de una expresión del gen Adrb1 tras la regulación por aumento del miR-19 en la célula neuroglial o la célula cardíaca.

60 De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, cuando la regulación comprende la regulación por disminución de la expresión del gen CB1, la modulación comprende la regulación por aumento del miR-19 en la célula neuroglial.

65 De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende además la medición de una expresión del gen CB1 tras la regulación por aumento de CB1 en la célula neuroglial.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, cuando la regulación comprende la regulación por disminución de la expresión del gen del receptor de CRH de tipo 1, la modulación comprende la regulación por aumento del miR-15 en la célula neuroglial.

- 5 De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende además la medición de una expresión del gen del receptor de CRH de tipo 1 tras la regulación por aumento de miR-15 en la célula neuroglial.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, cuando la regulación comprende la regulación por disminución de la expresión del gen FKBP5, la modulación comprende la regulación por aumento del miR-15 en la
10 célula neuroglial.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende además la medición de una expresión del gen FKBP5 tras la regulación por aumento de miR-15 en la célula neuroglial.

- 15 De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el método comprende además la obtención de una muestra de sangre del sujeto antes del tratamiento.

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el fármaco antidepresivo se selecciona del grupo que consiste en inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI), antidepresivos tricíclicos e inhibidores de la recaptación de noradrenalina (NRI).
20

De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, la afección médica asociada con la serotonina es una afección psiquiátrica.

- 25 De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, la afección psiquiátrica se selecciona del grupo que consiste en una depresión, una ansiedad, un estrés, una fatiga, una función cognitiva deteriorada, una ataque de pánico, un comportamiento compulsivo, una adicción, una fobia social, un trastorno del sueño, un trastorno relacionado con la alimentación, un trastorno del crecimiento y un trastorno de la reproducción.

- 30 De acuerdo con algunas realizaciones de la divulgación, el miR-135 comprende miR-135a o miR-135b.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y/o científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto en la materia al que pertenece la invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o en el ensayo de realizaciones de la invención, a continuación, se describen métodos y/o materiales
35 ilustrativos. En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos, y no pretenden ser necesariamente limitantes.

Breve descripción de los dibujos

- 40 Algunas realizaciones de la invención se describen en el presente documento, solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Haciendo ahora referencia específicamente a los dibujos en detalle, se hace hincapié en que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y con fines ilustrativos de las realizaciones de la invención. En este sentido, la descripción tomada con los dibujos muestra de manera evidente a los expertos en la
45 materia cómo se pueden poner en práctica las realizaciones de la invención.

En los dibujos:

- Las FIG. 1A-I representan la expresión de microARN en neuronas de serotonina (5HT). La Figura 1A es una
50 ilustración gráfica de miARN expresados diferencialmente en las neuronas 5HT. Los valores normalizados de Lowes se representan como un cambio de $\ln 2$ veces de la intensidad de la mancha con respecto al logaritmo de la intensidad media (gráfica de MA); la Figura 1B es una validación de los resultados de la matriz en la PCR en tiempo real de miR que indica niveles aumentados de miR-375 en las neuronas 5HT en comparación con el control. $n = 5$, células 5HT, $n = 4$, no 5HT. Las barras representan la media $\pm$ ETM $**p = 0,0071$; La Figura 1C es una validación de los resultados de la matriz en la PCR en tiempo real de los miR que indica la disminución de los niveles de miR-135a en las neuronas 5HT en comparación con el control. $n = 5$ células 5HT, $n = 4$ no 5HT. $**p = 0,0075$; La Figura 1D es un diagrama de Van que representa las predicciones bioinformáticas de cruce para Slc6a4 con los resultados de las micromatrices de 5HT y enumera los miR seleccionados para los ensayos *in vitro*; la Figura 1E es un diagrama de Van que representa las predicciones bioinformáticas de cruce para Htr1a con los resultados de las micromatrices de 5HT y enumera los miR seleccionados para los ensayos *in vitro*; la
60 Figura 1F es un diagrama de Van que representa las predicciones bioinformáticas de cruce para Tph2 con los resultados de las micromatrices de 5HT y enumera los miR seleccionados para los ensayos *in vitro*; la Figura 1G es un diagrama de Van que representa las predicciones bioinformáticas de cruce para MaoA con los resultados de las micromatrices de 5HT y enumera los miR seleccionados para los ensayos *in vitro*; la Figura 1H es una
65 gráfica que ilustra los resultados del ensayo de indicador de luciferasa que indican que miR-181c y miR-27b

pueden dirigirse a UTR de 3' de Tph2; y la Figura 1I es una gráfica que ilustra los resultados del ensayo de indicador de luciferasa que indican que miR-27b puede dirigirse a MaoA de Htr1a diana.

Las FIG. 2A-H representan la dirección para microARN de UTR de 3' de Slc6a4 (SEQ ID NO: 25) y UTR de 3' de Htr1a (SEQ ID NO: 27). La Figura 2A es una ilustración de la dirección para miR-135a y miR-135b (SEQ ID NO: 24 y 26, respectivamente) de UTR de 3' de Slc6a4; la Figura 2B es una ilustración de la dirección para miR-135a y miR-135b (SEQ ID NO: 24 y 26, respectivamente) de UTR de 3' de Htr1a; la Figura 2C es una gráfica que ilustra los resultados del ensayo con indicador de luciferasa que indican que miR-135a y miR-135b pueden dirigirse a la UTR de 3' de Slc6a4. Los datos de ensayo de luciferasa representan la actividad de la luciferasa de renilla normalizada con respecto a la actividad de un indicador de luciferasa de luciérnaga cotransfectado en células HEK293 transfectadas con la UTR de 3' del gen descrito y un vector vacío, o un vector que sobreexpresa un miR específico. Las barras representan la media $\pm$ ETM * $p = 0,014$, *** $p = 0,0002$, para miR-16 # $p < 0,0535$, para miR-27 # $p = 0,0967$; la Figura 2D es una gráfica que ilustra los resultados del ensayo de indicador de luciferasa que indican que miR-135a, miR-135b, miR-335, miR-181C y miR-26a pueden dirigirse a UTR de 3' de Htr1a. *** $p < 0,0001$, ** $p = 0,0029$; la Figura 2E es una ilustración de la conservación en UTR de 3' de slc6a4 de los apareamientos semilla para miR-135 (SEQ ID NO: 27-41); la Figura 2F es una ilustración de los apareamientos semilla de UTR de 3' de Htr1a para miR-135 (SEQ ID NO: 42-54), que indican que la semilla 1 que solo aparece en la UTR de 3' de ratón y la semilla 2 está altamente conservada; la Figura 2G es una gráfica que ilustra que la mutación en el apareamiento semilla de miR-135 en la UTR de 3' de slc6a4 bloqueó el efecto represor de miR-135a y miR-135b. *** $p < 0,0001$, ** $p = 0,0032$; y la Figura 2H es una gráfica que ilustra la mutación en los apareamientos semilla de miR-135 en la UTR de 3' de Htr1a individualmente y conjuntamente, lo que indica que miR-135b se dirige a Htr1a a través de los apareamientos semilla y de miR-135a solo mediante la semilla 2. *** $p < 0,0001$.

Las FIG. 3A-J representan los niveles miR-135a y miR-135b en diferentes condiciones. La Figura 3A es una gráfica que ilustra la regulación por disminución de los niveles de miR-135a en el RN tras un estrés agudo. Las barras representan la media $\pm$ ETM ($n = 8$ en el grupo 0, $n = 10$ en el grupo 90 y $n = 9$ en el grupo 24) *** $p < 0,0001$, * $p = 0,0357$; la Figura 3B es una gráfica que ilustra la regulación por disminución de los niveles de miR-135b en el RN tras un estrés agudo. *** $p < 0,0001$, ** $p = 0,0055$; la Figura 3C es una gráfica que ilustra la regulación por aumento de los niveles de miR-135a en el RN después de la administración aguda y crónica de imipramina independientemente de si los ratones se expusieron a rechazo social. ($n = 8$ en solución salina crónica de control y control de imipramina crónica, $n = 7$ imipramina aguda, $n = 11$ solución salina crónica, $n = 9$ en la imipramina crónica de rechazo social) ** $p = 0,003$; la Figura 3D es una gráfica que ilustra la regulación por aumento de los niveles de miR-135b en el RN tras la administración aguda y crónica de imipramina independientemente de si los ratones se expusieron al rechazo social. ** $p < 0,0093$, la Figura 3E es una gráfica que ilustra el aumento de los niveles de miR-135a en el RN después de la administración aguda y crónica de SSRI, y no de NRI o solución salina. ($n = 8$ en cada grupo aparte de la solución salina aguda, $n = 7$) *** $p = 0,0001$; la Figura 3F es una gráfica que ilustra los niveles de miR-135b inalterados en el RN tras la administración aguda o crónica de SSRI o NRI; la Figura 3G es una gráfica que ilustra la disminución en los niveles de miR-135a en el plasma de ratones que reciben SSRI crónico o agudo en comparación con los controles. ($n = 8$ en cada grupo aparte de SSRI y NRI crónicos, $n = 7$) ** $p = 0,0004$ para SSRI agudo en comparación con solución salina aguda y ** $p = 0,0006$ para SSRI crónico en comparación con solución salina crónica; la Figura 3H es una gráfica que ilustra los niveles de miR-135b sin cambios en el plasma de ratones que reciben SSRI crónico o agudo en comparación con los controles; la Figura 3I es una gráfica de representación de la dispersión que muestra los niveles de miR-135a de ratones individuales en el RN en comparación con el plasma que indican una correlación inversa en ratones que reciben tratamiento con SSRI o con solución salina; y la Figura 3J es una gráfica de representación de la dispersión que demuestra que no hay correlación entre los niveles de miR-135b en el RN al plasma en ratones que reciben tratamiento con SSRI en comparación con los controles.

Las FIG. 4A-H representan la sobreexpresión *in vivo* de miR-135b. La Figura 4A es una ilustración esquemática de lentivirus para la sobreexpresión de miR-135b; la Figura 4B es una gráfica que ilustra los resultados de PCR en tiempo real que indican la sobreexpresión de miR-135b *in vivo* en el núcleo de café dorsal (DRN) de ratones adultos. Las barras representan la media $\pm$ ETM ($n = 5$, GFP inyectado y $n = 3$ miR-135 OE); $p = 0,0032$; las Figuras 4C-D son ilustraciones de un sitio de inyección de DRN mediante la demostración de tinción con GFP en el sitio de las inyecciones. (Mapa de sección adoptado de Paxinos); la Figura 4E es una gráfica que ilustra la disminución del tiempo de inmovilidad en el ensayo de natación forzada en ratones que sobreexpresan miR-135b en el RN en comparación con los ratones de control. ($n = 9$, control; $n = 9$, miR-135) $p = 0,0088$ en el minuto 3 y $p = 0,00330$ para el minuto 4; la Figura 4F es una gráfica que ilustra la reducción del tiempo de inmovilidad en el ensayo de suspensión por la cola en ratones que sobreexpresan miR-135b en el RN en comparación con los ratones de control. $p = 0,07351$; las Figuras 4G-H son gráficos que no ilustran ninguna diferencia en la locomoción en jaulas domésticas de ratones que sobreexpresan miR-135b en el RN en comparación con los controles. La FIG. 5 representa la UTR de 3' de ADRb1 clonada siguiendo el gen de la luciferasa. Ilustración de la UTR de 3' de ADRb1 intacta (superior), que alberga cuatro sitios de unión a miR-19 y la forma mutante (inferior) de la UTR de 3' de ADRb1, que carece de los cuatro sitios de unión a miR-19, clonados cadena abajo del gen de luciferasa en el plásmido Psicheck2.

Las Fig. 6A-E representan que miR-19b se dirige a la UTR de 3' de ADRb1 a través de apareamiento de semilla en su UTR de 3'; las Figuras 6A-B son gráficas que ilustran los niveles de luciferasa normalizados medidos en células HT22 que expresan niveles de miR-19 endógenos bajos tras la transfección con el plásmido GFP (Figura

6A) o el plásmido de sobreexpresión (OE) de pre-miR-19b (Figura 6B); las Figuras 6C-E son gráficas que ilustran los niveles de luciferasa normalizados medidos en células HEK293T que expresan niveles de miR-19 endógenos elevados. Transfección con el plásmido de control (Figura 6C), la sonda de desactivación (KD) de miR-19b (Figura 6D) o la sonda codificada como control, y transfección (Figura 6E) con plásmido miArrest de miR-19b o plásmido miArrest de control. *** $p < 0,005$. La actividad de la luciferasa de Renilla se normalizó mediante los niveles de expresión de la luciferasa de la luciérnaga y se presentó como la relación de la actividad alcanzada por la forma mutante de UTR de 3' de Adb1 (Adb1-mut) en presencia del tratamiento de control.

Las FIG. 7A-D representan la expresión diferencial de miARN en la amígdala. Las Figuras 7A-B son gráficas que ilustran la expresión diferencial de miARN en la amígdala 90 minutos después del estrés agudo. La Figura 7A ilustra los resultados de la matriz de Agilent. La Figura 7b ilustra los resultados de la matriz affymetrix. Los valores normalizados se representan como la relación log2 (estrés frente al control) de la intensidad del punto trazada en función de las intensidades medias a través de las condiciones ($n = 2,2$). La intensidad de cada miARN se calculó como la intensidad media normalizada a través de repeticiones biológicas. MiR-15a y miR-15b se indican en rojo. MiR-124, un marcador neuronal bien establecido que no está afectado por el protocolo de estrés, está indicado en blanco; la Figura 7C ilustra que miR-15a y miR-15b tienen un apareamiento de semilla semiconservado en el receptor UTR de 3' de la hormona liberadora de corticotropina de tipo 1 [CRHR1, adaptado de targets.org]; y la Figura 7D es un gráfico que ilustra la actividad luciferasa medida en células HEK293T transfectadas junto con miR-15b-EGFP que sobreexpresan o expresan con GFP plásmido y un plásmido indicador de luciferasa controlado por CRFR1-UTR de 3'. La actividad de la luciferasa de Renilla se normalizó mediante los niveles de expresión de luciferasa de luciérnaga. La FIG. 8 es un gráfico que ilustra los resultados del ensayo con indicador de luciferasa que indican que miR-182 probablemente se dirija a la UTR de 3' de Htr1a. Los datos de los ensayos de luciferasa representan la actividad luciferasa de renilla normalizada con respecto a la actividad de un indicador de luciferasa de luciérnaga cotransfectado en células HEK293 transfectadas con la UTR de 3' del gen descrito y un vector vacío, o un vector que sobreexpresa un miR específico. La FIG. 9 es un gráfico que ilustra los resultados de PCR en tiempo real de los niveles de expresión de miR-182 en DRN de ratones adultos, que indican una tendencia a la disminución de la expresión tras un rechazo social crónico. Los datos representan la media $\pm$ ETM, $n = 7$ controles y 18 ratones en el grupo de rechazo social, $\# = p = 0,1$. La Fig. 10 es un diagrama de van que representa las predicciones bioinformáticas *in silico* para las dianas de miR-182 en dos algoritmos y una lista de genes diana potencialmente relevantes para la función neuronal normal y patológica que aparecen en esta predicción.

Las FIG. 11A-C representan la sobreexpresión o desactivación de miR-182. La Figura 11A es una ilustración esquemática de lentivirus para la sobreexpresión de miR-182; la Figura 11B es un gráfico que ilustra los resultados de la PCR en tiempo real que indican la sobreexpresión de miR-182 *in vitro* en la estirpe celular N2A; y la Figura 11C es una ilustración esquemática de los lentivirus para la desactivación de miR-182.

Las Fig. 12A-D representan los niveles de miR-19 en el PFC después de la administración de NRI. La reboxetina NRI se administró de forma aguda (una vez) o crónica (durante 18 días). Cabe señalar que los niveles de miR-19a y miR-19b disminuyeron en el PFC después de la administración aguda de NRI (Figura 12A y Figura 12B, respectivamente), pero aumentaron después de la administración crónica de NRI (Figura 12C y Figura 12D, respectivamente).

Las Fig. 13A-D representan los niveles de miR-19 en el PFC y la amígdala de ratones sometidos a rechazo social. MiR-19a y miR-19b se midieron en muestras de amígdala tomadas de ratones que fueron sometidos a un paradigma de rechazo social. Cabe señalar que los niveles de miR-19a y miR-19b en el PFC se elevaron en los ratones clasificados como "Susceptibles" al rechazo social en relación con los ratones de control (Figura 13A y Figura 13B, respectivamente). Los niveles de MiR-19 también fueron elevados en la amígdala de los ratones clasificados como "Susceptibles" al rechazo social en relación con el control de ratones (Figura 13C y Figura 13D, respectivamente). La FIG. 14 representa el miARN-19b dirigido a UTR de 3' de CB1. La transfección de células HT-22 con UTR de 3' de CB1 y los plásmidos que sobreexpresan miR-19b o el control de GFP conducen a una disminución del 50 % en los niveles de luciferasa normalizados.

Las Fig. 15A-B son ilustraciones esquemáticas de una sección coronal del cerebro del ratón. La Figura 15A muestra varios núcleos en el cerebro incluyendo el BLA (adaptado del cerebro de ratón por Paxinos y Franklin); la Figura 15B muestra una distribución de CB1 en el cerebro (adaptada de Allen Brain Atlas www.mouse.brain-map.org/). Cabe señalar que es evidente por esta distribución que CB1 es abundante en el BLA. La FIG. 16 es una ilustración esquemática de un mecanismo propuesto para la consolidación de la memoria en el núcleo basolateral de la amígdala (BLA). La corticosterona (CORT) se une a un receptor glucocorticoide unido a la membrana (mbGR) aún sin caracterizar que activa la vía Gs-cAMP/PKA para inducir la síntesis de endocannabinoides (eCB). Los endocannabinoides se liberan en la sinapsis donde se unen a los receptores CB1 en los terminales GABAérgicos que inhiben la liberación de GABA. Esta inhibición de la liberación de GABA desinhibe la liberación de norepinefrina (NE) y aumenta la activación del NE de β -adrenorreceptores postsinápticos, aumentando la consolidación de los recuerdos emocionalmente desagradables.

Las FIG. 17A-B ilustran Ago2 en el complejo RISC. La Figura 17A es una ilustración esquemática de Ago2 en el complejo RISC, que media la interacción entre el miARN y el ARNm; la Figura 17B ilustra un análisis de transferencia Western realizado con anticuerpo anti-Ago2. Este IP fue específico para la proteína Ago2 como puede verse cuando se compara la muestra cerebral total que se precipitó una vez con el anticuerpo Ago2 y una vez con el control de IgG1. Cabe señalar que no hubo detección de la proteína Ago2 en las muestras precipitadas con el control de IgG1.

Las Fig. 18A-D representan un ensayo de evitación social. Se colocaron los ratones en un laberinto durante 3 minutos solo para su habituación (Figura 18A y Figura 18B) y se registró y se representó su movimiento. Después de 3 minutos, se colocó un ratón ICR noval en la cámara junto al ratón examinado (Figura 18C y Figura 18D) y se registró el movimiento del ratón examinado y volvió a representar. La FIG. 19A representa una ilustración de mapa térmico de miARN seleccionados regulados por aumento en las matrices. La FIG. 19B representa una ilustración de mapa térmico de miARN seleccionados regulados por disminución en las matrices. Las FIG. 20A-B representan una expresión log2 de miR-15a (Figura 20A) y FKBP5 (Figura 20B) a partir de los resultados de las micromatrices. Cada punto rojo se refiere a una repetición de una matriz. El grupo de control (CNT) tuvo 4 repeticiones, el grupo "Susceptible" (SUSC) tuvo 3 repeticiones y el grupo "Resiliente" (RESIL) tuvo 3 repeticiones. La línea negra mostraba la media de las repeticiones en cada grupo. La FIG. 20C representa una secuencia de UTR de 3' de FKBP5 de ratón (tomada de targetscan.org). Las FIG. 21A-B representan los niveles de miR-15a de amígdala (Figura 21A) y FKBP5 (Figura 21B) en ratones "Susceptibles" en relación con los ratones de control tras el rechazo social. Cabe señalar que los niveles de miR-15a se elevaron en la amígdala de ratones sometidos a rechazo social y caracterizados como "Susceptibles" (Figura 21A). Los niveles de FKBP5 disminuyeron en la amígdala de ratones sometidos a rechazo social y caracterizados como "Susceptibles" (Figura 21B). La Fig. 22 es una ilustración esquemática de la UTR de 3' de Stx1a, Sgk1 y Adrb2, que albergan cada uno un solo sitio de unión a miARN-15. La FIG. 23 representa los niveles de miR-181 de amígdala en ratones sometidos al rechazo social con respecto a ratones de control. Cabe señalar que los niveles de miR-181 se elevaron en la amígdala de ratones sometidos al rechazo social. La FIG. 24 representa diagramas de Van que representan predicciones bioinformáticas de cruce para miR-181 y receptores de glutamato. La FIG. 25 es una ilustración esquemática de la UTR de 3' intacta de 6 posibles dianas de miR-181. La FIG. 26 representa los niveles de expresión de miR182 en el núcleo del rafe tras el estrés. Cabe señalar que un estrés agudo de inmovilidad de 30 minutos condujo a la disminución de los niveles de expresión de miR 182 en el RN cuando se ensayó 24 horas después del estrés, medida por PCR en tiempo real. ** = $p < 0,01$; $n = 8$ en cada grupo.

Las FIG. 27A-C representan los resultados de un ensayo de indicador de luciferasa que indican que miR182 se dirige a la UTR de 3' de DSCAM, L1CAM y TSNAX. La Figura 27A ilustra datos de ensayos de luciferasa que representan la actividad de luciferasa de renilla normalizada con respecto a la actividad de un indicador de luciferasa de luciérnaga cotransfectado en células N2a transfectadas con la UTR de 3' de los genes descritos y un vector vacío o un vector que sobreexpresa un miR específico. La mutación en el apareamiento semilla de miR182 en las UTR de 3' de L1cam (Figura 27B) y Tsnax (Figura 27C) bloqueó el efecto de represión de miR182. Las barras representan la media $\pm$ ETM * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Las Fig. 28A-D representan la expresión de miR135 en la amígdala (AMÍ) y la corteza prefrontal (PFC). La Figura 28A ilustra que el SSRI y el NRI agudos aumentaron los niveles de miR135a en la AMÍ; la Figura 28B ilustra que los niveles de miR135b en la AMÍ se regularon por aumento mediante la administración aguda de SSRI o NRI en comparación con la solución salina; la Figura 28C ilustra que el SSRI crónico disminuyó los niveles de miR135a en el PFC; y la Figura 28D ilustra que los niveles de miR135b en el PFC se regularon por aumento mediante el SSRI o el NRI agudo, y disminuyeron con el tratamiento crónico con SSRI. $n = 7-8$ en cada grupo * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,0001$.

Las FIG. 29A-B representan niveles de miR135 aumentados en el sistema de circulación de los ratones después del rechazo social. Los niveles de miR135a (Figura 29A) y miR135b (Figura 29B) en plasma de los ratones dos semanas después del rechazo social aumentaron significativamente en comparación con los ratones de control (** = $p < 0,01$, $n = 7-16$ en cada grupo).

Las FIG. 30A-E representan la validación de miR135 KD *in vitro* e *in vivo*. Las Figuras 30A-B ilustran los resultados de un ensayo con indicador de luciferasa que indican que la dirección para miR135 de Htr1a (Figura 30A) y slc6a4 (Figura 30B) fue bloqueada por la construcción miR135b KD; la Figura 30C es una ilustración esquemática de miR135bKD y vectores víricos de control; y las Figuras 30D-E son ilustraciones de un sitio de inyección de DRN (Figura 30D adoptada de Paxinos), y la Figura 30E es una tinción de GFP de DRN infectado con lentivirus de miR135 KD.

Las FIG. 31A-G representan un mayor comportamiento de tipo ansiedad y una respuesta atenuada hacia SSRI en ratones miR135KD. La Figura 31A ilustra que el comportamiento de ratones miR135KD fue similar a los ratones de control en el ensayo de campo abierto; la Figura 31B ilustra un mayor comportamiento de tipo ansiedad en ratones miR135KD en comparación con los ratones control en el laberinto en cruz elevado; la Figura 31C ilustra que, en el ensayo de transferencia de cámara oscura-luminosa, los ratones miR135KD pasaron más tiempo en la cámara de luz en comparación con los ratones de control en condiciones de estrés basal, pero no después del estrés agudo; la Figura 31D ilustra que los ratones miR135KD visitaron la cámara luminosa más veces en comparación con los ratones de control en condiciones de estrés basal, pero no después del estrés agudo; la Figura 31E ilustra que los ratones miR135KD se trasladaron menor distancia en la cámara luminosa en comparación con los ratones de control, en condiciones de estrés basal, pero no después del estrés agudo; la Figura 31F no ilustra ninguna diferencia entre los ratones miR135KD y los ratones de control en el ensayo de suspensión por la cola tanto en condiciones basales como después de la administración de SSRI, pero se observó una reducción en el tiempo de inmovilidad después del tratamiento con SSRI en comparación con la condición basal en ambos grupos. (Figuras 31F-G). El tiempo de inmovilidad fue reducido por el SSRI en ambos grupos, sin embargo la reducción se atenuó en los ratones miR135KD en comparación con los controles en los últimos 2 minutos del ensayo. ~ $p < 0,1$ * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. $n = 10-11$ en cada grupo. La FIG. 32 es una ilustración esquemática del sistema de sobreexpresión inducible de ratones miR135. Ratones

transgénicos que expresan parada transaccional flanqueada por sitios LoxP antes de la secuencia de miR135a y del indicador GFP. Los ratones transgénicos mutantes expresan miR135a solo en células positivas en ePet de 5-HT.

Las FIG. 33A-C representan la validación de una línea de ratones que sobreexpresan miR135 en neuronas 5-HT. La Figura 33A ilustra que miR135 se sobreexpresó en el RN de ratones miR135OE en comparación con los ratones de control. Las Figuras 33B-C ilustran que al ARNm de los genes diana de miR135 se regularon por disminución en el RN de ratones miR135OE, tanto Slc6a4 (Figura 33B) como Htr1a (Figura 33C). # = $p < 0,1$; * = $p < 0,05$; n = 4 en cada grupo.

Las FIG. 34A-E representan la reducción de la ansiedad y del comportamiento de tipo depresivo tras el rechazo social en ratones miR135OE. La Figura 34A muestra que los ratones miR135OE tienen un comportamiento reducido de ansiedad en el ensayo de campo abierto; la Figura 34B muestra menos comportamientos de ansiedad en comparación con el control de ratones miR135OE en un ensayo de transferencia de oscuridad-luz; la Figura 34C muestra una disminución del comportamiento de tipo ansiedad en comparación con el control en el laberinto en cruz elevado de ratones miR135OE; la Figura 34D muestra una tendencia hacia la reducción del tiempo de inmovilidad de los ratones miR135OE en comparación con los controles en el ensayo de suspensión por la cola; y la Figura 34E muestra una reducción del tiempo de inmovilidad en ratones miR135OE en comparación con los controles en el ensayo de natación forzada. # = $p < 0,1$ * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$, n = 7-11 en cada grupo.

Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente invención, en algunas realizaciones de la misma, se refiere a microARN y, más concretamente, pero no exclusivamente, al uso de los mismos para el diagnóstico, el control y el tratamiento de enfermedades.

Los principios y el funcionamiento de la presente invención pueden entenderse mejor con referencia a los dibujos y a las descripciones adjuntas.

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no se limita necesariamente a su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ilustrados por los ejemplos. La invención permite otras realizaciones o ser puesta en práctica o llevada a cabo de diversas maneras. Además, debe entenderse que la fraseología y la terminología empleadas en el presente documento son con fines descriptivos, y no deben considerarse limitantes.

El vínculo entre la actividad serotoninérgica desregulada y los trastornos psiquiátricos tales como la ansiedad y la depresión se ha establecido previamente; sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes a estas patologías no se conocen del todo. Los microARN (miR) son un subconjunto de pequeñas moléculas de ARN que regulan la expresión génica posterior a la traducción y son abundantes en el cerebro.

Al tiempo que reducen la presente invención a la práctica, los presentes inventores han descubierto que los microARN específicos (miR) están implicados en la regulación de los genes relacionados con la neuroglia de la serotonina (5HT) y, por lo tanto, participan en la modulación de afecciones médicas asociadas con los niveles aberrantes de serotonina tales como los trastornos psiquiátricos.

Como se ilustra en el presente documento y en el apartado de ejemplos a continuación, los presentes inventores determinaron el patrón de expresión de miR en las neuronas 5HT, obtenidas a partir del núcleo de rafé (RN) de ratones con indicador de 5HT (ePET-YFP), usando micromatrices de miR (véanse las Tablas 2A-B del apartado de ejemplos a continuación). El perfil de expresión único de miR de las neuronas serotoninérgicas obtenidas de la matriz se analizó mediante bioinformática para identificar los miR que dirigen supuestamente los genes relacionados con las neuronas serotoninérgicas, tales como el transportador de serotonina (Slc6a4, Figura 1D), autorreceptor de serotonina (Htr1a, Figura 1E), triptófano hidroxilasa 2 (Tph2, Figura 1F) y monoamina hidroxilasa (Mao A, Figura 1G). Los miARN de las UTR de 3' para estos genes se ensayaron además *in vitro* ilustrando los miR específicos (por ejemplo, miR-135) que dirigen específicamente y regulan los genes neuronales 5HT (véanse las Figuras 1H-I y las Figuras 2C-D). Los presentes inventores han ilustrado además que los niveles de expresión de miR-135 están alterados en el RN y en el plasma después del estrés agudo (Figuras 3A-D) y después del tratamiento con antidepresivos (Figuras 3E-J). La sobreexpresión *in vivo* de miR-135 en el RN de ratones adultos redujo los comportamientos de tipo depresivo después del rechazo social (Figuras 4A-H). Además, los presentes inventores han ilustrado la actividad de miR-182 como regulador de la actividad neuronal (a través de la represión directa de Htr1a, Figura 8) y del comportamiento psicopatológico (Figura 9), y de miR-15 como regulador de la respuesta al estrés [a través de la represión directa de CRH1R (Figuras 7A-B), proteína de unión a FK506 5 (FKBP5) (Figuras 21A-B) y Stx1a, Sgk1 y Adrb2 (Figura 22)]. Los presentes inventores también han ilustrado la dirección específica del receptor beta adrenérgico (Adrb1) y el receptor canabinoide 1 (CB1) por miR-19. La sobreexpresión de miR-19 reprimió Adrb1 (Figuras 6A-C), mientras que la desactivación de miR-19 potenció la expresión de Adrb1 (Figuras 6D-E). La sobreexpresión de miR-19 también reprimió CB1 (Figura 14). Los presentes inventores también han descubierto dianas para miR-181. En concreto, los presentes inventores han ilustrado que el miR-181 regula específicamente los receptores de glutamato (Figuras 24 y 25). Tomados en conjunto, estos resultados justifican el

uso de miARN o secuencias que los regulan, tales como miR-135, miR-335, miR-181, miR-182, miR-26, miR-27, miR-15 y miR-19, como modalidades terapéuticas.

Así pues, de acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método de tratamiento de una afección médica en la que una elevación del nivel de serotonina es terapéuticamente beneficioso en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar a o expresar en una célula del sujeto un polinucleótido exógeno que codifique al menos un microARN o un precursor del mismo.

De acuerdo con una realización específica, para el tratamiento de una afección médica en la que una elevación del nivel de serotonina es terapéuticamente beneficioso, el microARN comprende miR-135, miR-335, miR-26 y miR-182.

De acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método de tratamiento de una afección médica en la que un nivel bajo de adrenalina o noradrenalina es terapéuticamente beneficioso en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar a o expresar en una célula del sujeto un polinucleótido exógeno que codifique un microARN o un precursor del mismo.

De acuerdo con una realización específica, para el tratamiento de una afección médica en la que un nivel bajo de adrenalina o noradrenalina es terapéuticamente beneficioso, el microARN comprende miR-19.

De acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método de tratamiento de una afección médica en la que un nivel bajo de hormona liberadora de corticotropina (CRH) es terapéuticamente beneficioso en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar a o expresar en una célula del sujeto un polinucleótido exógeno que codifique un microARN o un precursor del mismo.

De acuerdo con una realización específica, para el tratamiento de una afección médica en la que un nivel bajo de hormona liberadora de corticotropina (CRH) es terapéuticamente beneficioso, el microARN comprende miR-15.

De acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método de tratamiento de una afección médica en la que un nivel bajo de receptor de glutamato es terapéuticamente beneficioso en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar a o expresar en una célula del sujeto un polinucleótido exógeno que codifique un microARN o un precursor del mismo.

De acuerdo con una realización específica, para el tratamiento de una afección médica en la que un nivel bajo de receptor de glutamato es terapéuticamente beneficioso, el microARN comprende miR-181.

El término "tratar" se refiere a inhibir o detener el desarrollo de una enfermedad, de un trastorno o de una afección y/o provocar la reducción, remisión o regresión de una enfermedad, de un trastorno o de una afección, o evitar que ocurra una enfermedad, un trastorno o una afección médica en un sujeto que puede estar en riesgo de sufrir la enfermedad, el trastorno o la afección, pero que todavía no haya sido diagnosticado de la enfermedad, el trastorno o la afección. Los expertos en la materia comprenderán que se pueden usar diversas metodologías y ensayos para evaluar el desarrollo de una enfermedad, de un trastorno o de una afección y, de manera similar, pueden usarse diversas metodologías y ensayos para evaluar la reducción, remisión o regresión de una enfermedad, de un trastorno o de una afección.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye mamíferos, preferentemente seres humanos de cualquier edad que padecen la patología. Preferentemente, este término abarca individuos que están en riesgo de desarrollar la patología.

Como se usa en el presente documento, la expresión "afección médica en la que una elevación del nivel de serotonina es terapéuticamente beneficiosa" se refiere a una enfermedad o un trastorno en el que el aumento del nivel de serotonina puede prevenir la aparición de una enfermedad o de síntomas médicos asociados con la misma, o detener la progresión de la enfermedad o de síntomas asociados con la misma (como se detalla a continuación).

Como se usa en el presente documento, el término "serotonina" se refiere al neurotransmisor de monoamina [también denominado 5-hidroxitriptamina (5-HT)]. La serotonina se expone, por ejemplo, en el número CAS 50-67-9.

De acuerdo con una realización, se proporciona un método de aumento del nivel de serotonina en una hendidura sináptica, comprendiendo el método administrar a o expresar en una célula neuroglial, por ejemplo, neurona serotoninérgica del sujeto un polinucleótido exógeno que codifique al menos un microARN o un precursor del mismo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "hendidura sináptica" se refiere a la zona entre dos neuronas a través de la que pasan señales eléctricas o químicas.

Una "célula neuroglial" se refiere a una neurona o una célula glial (por ejemplo, oligodendrocitos o astrocitos).

Como se usa en el presente documento, la expresión "neurona serotoninérgica" se refiere a una neurona que segrega serotonina o que es capaz de recaptar serotonina (es decir, transportadores de serotonina expresados en sus superficies celulares).

5 La afección médica en la que una elevación del nivel de serotonina es terapéuticamente beneficiosa puede comprender, por ejemplo, cualquier trastorno del estado de ánimo incluyendo depresión, ansiedad, estrés, fatiga, deterioro de la función cognitiva, ataque de pánico, comportamiento compulsivo, adicción, fobia social; trastorno del sueño, trastorno relacionado con la alimentación, trastorno del crecimiento y trastorno reproductivo.

10 De acuerdo con una realización específica, la afección médica en la que una elevación del nivel de serotonina es terapéuticamente beneficiosa comprende la depresión.

De acuerdo con una realización, cuando la afección médica es depresión o ansiedad, el microARN es miR-135.

15 Se apreciará que la depresión o la ansiedad pueden no estar necesariamente relacionadas con la serotonina.

Como se usa en el presente documento, la expresión "afección médica en la que un nivel bajo de adrenalina o noradrenalina es terapéuticamente beneficioso" se refiere a una enfermedad o a un trastorno en el que la disminución de la expresión o actividad de la adrenalina o noradrenalina puede prevenir la aparición de una enfermedad o síntomas médicos asociados con la misma o detener la progresión de la enfermedad o de los síntomas médicos asociados con la misma (como se detalla mejor en el presente documento más adelante).

20 Como se usa en el presente documento, el término "adrenalina" se refiere a la hormona y al neurotransmisor (también conocido como epinefrina). La adrenalina se expone, por ejemplo, en el número CAS 51-43-4.

25 Como se usa en el presente documento, el término "noradrenalina" se refiere a la catecolamina que actúa como una hormona y un neurotransmisor (también conocido como norepinefrina). La noradrenalina se expone, por ejemplo, en los números CAS (1) 51-41-2 (1) y 138-65-8(dl).

30 La afección médica en la que un nivel bajo de adrenalina o noradrenalina es terapéuticamente beneficioso puede comprender, por ejemplo, trastorno relacionado con el estrés, ansiedad, deterioro de la memoria, afecciones cardíacas (por ejemplo, palpitaciones, taquicardia, arritmia), dolores de cabeza, temblores, hipertensión y edema pulmonar agudo.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "afección médica en la que un nivel bajo de hormona liberadora de corticotropina (CRH) es terapéuticamente beneficioso" se refiere a una enfermedad o a un trastorno en el que la disminución de la expresión o actividad de CRH puede prevenir la aparición de una enfermedad o síntomas médicos asociados con la misma o detener la progresión de la enfermedad o de los síntomas médicos asociados con la misma (como se detalla mejor en el presente documento más adelante).

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "hormona liberadora de corticotropina (CRH)" se refiere a la hormona polipeptídica y al neurotransmisor (también conocido como factor de liberación de corticotropina (CRF) o corticoliberina). La CRH se expone, por ejemplo, en NP_000747.1.

45 La afección médica en la que un nivel bajo de CRH es terapéuticamente beneficioso puede comprender, por ejemplo, estrés, depresión, ansiedad, estrés, fatiga, deterioro de la función cognitiva, ataque de pánico, comportamiento compulsivo, adicción, fobia social; trastorno del sueño, trastorno relacionado con la alimentación, trastorno del crecimiento y trastorno reproductivo.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "afección médica en la que un nivel bajo de receptor de glutamato es terapéuticamente beneficioso" se refiere a una enfermedad o a un trastorno en el que la disminución de la expresión o actividad de un receptor de glutamato puede prevenir la aparición de una enfermedad o síntomas médicos asociados con la misma o detener la progresión de la enfermedad o de los síntomas médicos asociados con la misma (como se detalla mejor en el presente documento más adelante).

55 Como se usa en el presente documento, la expresión "receptor de glutamato" se refiere a un receptor sináptico localizado normalmente en las membranas de células neuronales (por ejemplo, Grm1, Grik3, Grm5, Gria2, Grik2 y Grm7). El receptor de glutamato se expone, por ejemplo, en NP_000822.2 [receptor de glutamato ionotrópico cainato 3 (Grik3)]; NP_001159719.1, NP_068775.1, NP_786944.1 [receptor de glutamato ionotrópico cainato 2 (Grik2)]; NP_000833.1, NP_001137303.1 [receptor de glutamato metabotrópico 5 (Grm5)]; NP_000835.1, NP_870989.1 [receptor de glutamato metabotrópico 7 (Grm7)]; NP_000829.2, NP_001107801.1 [receptor de glutamato metabotrópico (Grm1)].

65 La afección médica en la que un nivel bajo de receptor de glutamato es terapéuticamente beneficioso puede comprender, por ejemplo, ataques (por ejemplo, epilepsia), enfermedad de Huntington, esquizofrenia, síndrome de X frágil, trastorno de ansiedad generalizado y cáncer (por ejemplo melanoma).

Como se usa en el presente documento, la expresión "microARN o un precursor del mismo" se refiere a las moléculas de microARN (miARN) que actúan como reguladores posteriores a la traducción. Los microARN normalmente se procesan a partir de pre-miR (precursores pre-microARN). Los Pre-miR son un conjunto de moléculas miARN precursoras transcritas por la ARN polimerasa III que se procesan eficientemente en miARN funcional, por ejemplo, tras la transfección en células cultivadas. Un Pre-miR puede usarse para generar actividad específica de miARN en tipos de células que normalmente no expresan este miARN, dirigiendo así la función de su diana mediante regulación por disminución de su expresión en un experimento de "ganancia de función (de miARN)". Existen diseños de pre-miR a todos los miARN conocidos enumerados en el registro de microARN, y se pueden diseñar fácilmente para cualquier investigación. Los microARN pueden administrarse a la célula en sí o codificarse a partir de una molécula precursora ligada a una construcción de ácido nucleico, como se describe además en el presente documento a continuación.

Se apreciará que los microARN de las presentes enseñanzas pueden unirse, fijarse, regular, procesar, interferir, aumentar, estabilizar y/o desestabilizar cualquier diana de microARN. Dicha diana puede ser cualquier molécula, incluyendo, pero sin limitación, moléculas de ADN, moléculas de ARN y polipéptidos tales como, pero sin limitación, genes relacionados con la serotonina tales como el transportador de serotonina (es decir, SERT o Slc6a4), el receptor inhibitor de la serotonina 1a (Htr1a), triptófano hidroxilasa 2 (Tph2) y monoamina hidroxilasa (MaoA); receptores de adrenalina o de noradrenalina (receptores adrenérgicos tales como Adr1); adenilato ciclase de tipo 1 (ADCY1); receptores de CRH tales como Crh1R; o cualquier otra molécula, por ejemplo, proteína de unión a FK506 5 (FKBP5), receptor canabinoide 1 (CB1), molécula de adhesión celular del síndrome de Down (Dscam), proteína X asociada a Translin (Tsnax) y molécula de adhesión celular L1 (L1cam), todos descritos en el presente documento más adelante.

Se apreciará que los microARN de la presente invención se pueden identificar a través de diversas bases de datos que incluyen, por ejemplo, el registro de micro-ARN (<http://www.dotsangerdotacdotuk/Software/Rfam/mirna/indexdotshhtml>).

Los métodos de la presente divulgación pueden efectuarse administrando a o expresando en una célula del sujeto un polinucleótido exógeno que codifique un microARN.

El término "polinucleótido" se refiere a un oligómero o polímero monocatenario o bicatenario de ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. Este término incluye polinucleótidos y/u oligonucleótidos derivados de moléculas de ácidos nucleicos naturales (por ejemplo, ARN o ADN), polinucleótidos sintéticos y/o moléculas oligonucleotídicas compuestas de bases naturales, azúcares y enlaces internucleósidos covalentes (por ejemplo, cadena principal), así como polinucleótidos sintéticos y/u oligonucleótidos que tienen partes no naturales que funcionan de manera similar a las respectivas partes naturales.

La longitud del polinucleótido de la presente invención es opcionalmente de 100 nucleótidos o inferior, opcionalmente de 90 nucleótidos o inferior, opcionalmente de 80 nucleótidos o inferior, opcionalmente de 70 nucleótidos o inferior, opcionalmente de 60 nucleótidos o inferior, opcionalmente de 50 nucleótidos o inferior, opcionalmente de 40 nucleótidos o inferior, opcionalmente de 30 nucleótidos o inferior, por ejemplo, de 29 nucleótidos, 28 nucleótidos, 27 nucleótidos, 26 nucleótidos, 25 nucleótidos, 24 nucleótidos, 23 nucleótidos, 22 nucleótidos, 21 nucleótidos, 20 nucleótidos, 19 nucleótidos, 18 nucleótidos, 17 nucleótidos, 16 nucleótidos, 15 nucleótidos, opcionalmente entre 12 y 24 nucleótidos, opcionalmente entre 5-15, opcionalmente, entre 5-25, lo más preferentemente, de aproximadamente 20-25 nucleótidos.

Los polinucleótidos (incluyendo los oligonucleótidos) diseñados de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención pueden generarse de acuerdo con cualquier método de síntesis de oligonucleótidos conocido en la técnica, incluyendo síntesis enzimáticas o síntesis en fase sólida. El equipo y los reactivos para ejecutar la síntesis en fase sólida se encuentran disponibles en el mercado, por ejemplo, en Applied Biosystems. También pueden emplearse otros medios para dicha síntesis; la síntesis real de los oligonucleótidos es competencia de un experto en la materia y puede lograrse mediante metodologías establecidas como se detalla en, por ejemplo: Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"; Ausubel, R. M. *et al.*, eds. (1994, 1989), "Current Protocols in Molecular Biology," volúmenes I-III, John Wiley & Sons, Baltimore, Maryland; Perbal, B. (1988), "A Practical Guide to Molecular Cloning," John Wiley & Sons, Nueva York; y Gait, M. J., ed. (1984), "Oligonucleotide Synthesis"; utilizando química en fase sólida, por ejemplo, cianoetil fosforamida seguida de la desprotección, desalación y purificación mediante, por ejemplo, un método en tritilo automático o HPLC.

Se apreciará que es posible generar un polinucleótido que comprenda una molécula de ARN usando un vector de expresión como se describe más adelante más detalladamente.

Preferentemente, el polinucleótido de la presente invención es un polinucleótido modificado. Los polinucleótidos pueden modificarse usando diversos métodos conocidos en la técnica.

Por ejemplo, los oligonucleótidos o polinucleótidos de la presente invención pueden comprender nucleósidos heterocíclicos que consistan en las bases purinas y pirimidinas, unidas en un enlace fosfodiéster de 3' a 5'.

Preferentemente, los oligonucleótidos o polinucleótidos usados son los modificados bien en la cadena principal, los enlaces internucleósidos o las bases, como se describe ampliamente a continuación.

Los ejemplos específicos de oligonucleótidos o polinucleótidos preferidos útiles de acuerdo con este aspecto de la presente invención incluyen oligonucleótidos o polinucleótidos que contienen estructuras principales modificadas o enlaces internucleósidos no naturales. Los oligonucleótidos o polinucleótidos que tienen estructuras principales modificadas incluyen aquellos que conservan un átomo de fósforo en la cadena principal, como se describe en las patentes de EE.UU. n.º 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; y 5.625.050.

Las estructuras principales oligonucleotídicas o polinucleotídicas modificadas preferidas incluyen, por ejemplo: fosforotioatos; fosforotioatos quirales; fosforoditioatos; fosfotriésteres; aminoalquilfosfotriésteres; metil y otros alquilfosfonatos, incluyendo fosfonatos de 3'-alquilo y fosfonatos quirales; fosfinatos; fosforamidatos, incluyendo 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos; tionofosforamidatos; tionoalquilfosfonatos; tionoalquilfosfotriésteres; y boranofosfonatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos enlazados 2'-5' de estos y aquellos que tienen polaridad invertida, en la que los pares adyacentes de unidades nucleosídicas están unidos de 3'-5' a 5'-3' o de 2'-5' a 5'-2'. También se pueden usar diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre de las modificaciones anteriores.

Como alternativa, las estructuras principales de oligonucleótidos o polinucleótidos modificadas que no incluyen un átomo de fósforo en las mismas tienen estructuras principales que están formadas por enlaces internucleósido de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleósido de heteroátomo mixto y de alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleósido heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen los que tienen enlaces morfolino (formados en parte por la parte de azúcar de un nucleósido); estructuras principales de siloxano; estructuras principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; estructuras principales de formacetilo y tioformacetilo; estructuras principales de metilen-formacetilo y tioformacetilo; estructuras principales que contienen alqueno; estructuras principales de sulfamato; estructuras principales de metilenimino y metilenhidrazino; estructuras principales de sulfonato y sulfonamida; estructuras principales de amida; y otras que tienen partes componentes de N, O, S y CH₂ mixtas, como se desvela en las patentes de EE.UU. n.º 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; EP 2 739 736 B1 15 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439.

Otros oligonucleótidos o polinucleótidos que se pueden usar de acuerdo con la presente invención son los modificados tanto en el azúcar como en el enlace internucleosídico, es decir, la cadena principal de las unidades de nucleótidos se reemplaza por grupos nuevos. Las unidades de base se mantienen para la complementación con la diana de polinucleótido apropiada. Un ejemplo de dicho oligonucleótido mimético incluye un ácido peptidonucleico (PNA). Un oligonucleótido de PNA se refiere a un oligonucleótido en el que la cadena principal de azúcar se reemplaza por una cadena principal que contiene amida, en particular, una cadena principal de aminoetilglicina. Las bases se conservan, y están unidas directa o indirectamente a átomos de aza-nitrógeno de la parte amida de la cadena principal. Las patentes de los Estados Unidos que enseñan la preparación de compuestos de PNA incluyen, pero sin limitación, las patentes de EE.UU. n.º 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262; estando cada una de ellas incorporada en el presente documento por referencia. Otras modificaciones de la cadena principal que pueden usarse en la presente invención se describen en la patente de EE.UU. n.º 6.303.374.

Los oligonucleótidos o polinucleótidos de la presente invención también pueden incluir modificaciones o sustituciones de bases. Como se usa en el presente documento, las bases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases purínicas adenina (A) y guanina (G), y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las bases "modificadas" incluyen, pero sin limitación, otras bases sintéticas y naturales, tales como: 5-metilcitosina (5-me-C); 5-hidroximetilcitosina; xantina; hipoxantina; 2-aminoadenina; 6-metil- y otros derivados de alquilo de adenina y guanina; 2-propil- y otros derivados de alquilo de adenina y guanina; 2-tiouracilo, 2-tiomeimina y 2-tiocitosina; 5-halouracilo y citosina; 5-propinil-uracilo y citosina; 6-azo-uracilo, citosina y timina; 5-uracilo (pseudouracilo); 4-tiouracilo; 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas; 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo, y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos; 7-metilguanina y 7-metiladenina; 8-azaguanina y 8-azaadenina; 7-desazaguanina y 7-desazaadenina; y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Otras bases modificadas incluyen las desveladas en: la patente de EE.UU. n.º 3.687.808; Kroschwitz, J. I., ed. (1990), "The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering" páginas 858-859, John Wiley & Sons; Englisch *et al.* (1991), "Angewandte Chemie," Edición internacional, 30, 613; y Sanghvi, Y. S., "Antisense Research and Applications", Capítulo 15, páginas 289-302, S. T. Crooke y B. Lebleu, eds., CRC Press, 1993. Dichas bases modificadas son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Éstas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2-, N-6- y O-6-sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Las sustituciones 5-metilcitosina han demostrado aumentar la estabilidad del dúplex de ácidos nucleicos en 0,6-1,2 °C (Sanghvi, Y. S. *et al.* (1993), "Antisense Research and Applications", páginas 276-278, CRC Press, Boca Raton), y son actualmente sustituciones de bases preferidas, aún más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo.

De acuerdo con una realización específica, el polinucleótido de miARN de la presente divulgación tiene una secuencia de ácido nucleico como se expone en las SEQ ID NO: 58-94 (véase la Tabla 1A).

Tabla 1A: Secuencias polinucleotídicas de miARN

<i>Secuencia</i>	<i>miARN</i>
SEQ ID NO: 77-80	miR-15
SEQ ID NO: 72-76	miR-19
SEQ ID NO: 65-69	miR-26
SEQ ID NO: 81-84	miR-27
SEQ ID NO: 58-62	miR-135
SEQ ID NO: 85-94	miR-181
SEQ ID NO: 70-71	miR-182
SEQ ID NO: 63-64	miR-335

Como se ha mencionado anteriormente y se muestra en el apartado de ejemplo que se presenta más adelante, los microARN son moléculas procesadas derivadas de precursores específicos (es decir, pre-miARN), y la regulación por aumento de una función de miARN específica puede efectuarse usando una molécula precursora de miARN específica.

También se contemplan secuencias homólogas a los miARN y sus precursores. El nivel de homología debe ser relativamente alto para el miARN maduro, pero se permite más órdenes de libertad a nivel de precursor (por ejemplo, al menos el 60, 70, 80, 85, 90, 95 % o más) siempre y cuando las alteraciones de secuencia estén en la secuencia horquillada y no en el segmento de ácido nucleico correspondiente al miR maduro.

Dichos agentes polinucleotídicos precursores se administran normalmente a las células diana (por ejemplo, células neurogliales o células cardíacas) como parte de una construcción de expresión. En este caso, el agente polinucleotídico se liga en una construcción de ácido nucleico bajo el control de un elemento regulador que actúa en *cis* (por ejemplo, promotor) capaz de dirigir una expresión del microARN en las células diana (por ejemplo, células neurogliales o células cardíacas) de una manera constitutiva o inducible.

Los ejemplos de agentes polinucleotídicos de microARN de la presente invención incluyen, pero sin limitación, miR-15 (por ejemplo, ARN con n.º de acceso del GenBank NR_029485), miR-19 (por ejemplo, n.º de acceso del GenBank NR_029489.1), miR-26 (por ejemplo, n.º de acceso del GenBank NR_029500 y NR_029499), miR-27 (por ejemplo, n.º de acceso del GenBank NR_029501 RNA), miR-135 (por ejemplo, n.º de acceso del GenBank NR_029677.1), miR-335 (por ejemplo, n.º de acceso del GenBank NR_029899.1), miR-181 (por ejemplo, n.º de acceso del GenBank NR_029611.1) y miR-182 (por ejemplo, n.º de acceso del GenBank NR_029614).

Los ejemplos de promotores específicos de células neuronales incluyen, pero sin limitación, promotor de gen de enolasa específica de las neuronas, promotor de sinapsina, promotor de sinapsina potenciado, promotor de calmodulina de calcio y promotor de Thy1.

Los ejemplos de promotores específicos de las células cardíacas incluyen, pero sin limitación, promotor NCX1 cardíaco y promotor de cadena pesada de α -miosina (α MHC).

Las construcciones de expresión de la presente invención también pueden incluir secuencias adicionales que las hacen adecuadas para la replicación y la integración en eucariotas (por ejemplo, vectores lanzadera). Los vectores de clonación típicos contienen secuencias de iniciación de la transcripción y la traducción (por ejemplo, promotores, potenciadores) y terminadores de la transcripción y la traducción (por ejemplo, señales de poliadenilación). Las construcciones de expresión de la presente invención pueden incluir además un potenciador, que puede ser adyacente o distante a la secuencia promotora, y puede funcionar en la regulación por aumento de la transcripción a partir de las mismas.

Los elementos potenciadores pueden estimular la transcripción hasta 1.000 veces a partir de promotores homólogos o heterólogos unidos. Los potenciadores son activos cuando se sitúan cadena abajo o cadena arriba del sitio de iniciación de la transcripción. Muchos elementos potenciadores derivados de virus tienen una amplia selección de hospedadores y son activos en una variedad de tejidos. Por ejemplo, el potenciador de genes precoces de SV40 es adecuado para muchos tipos de células. Otras combinaciones de potenciador/promotor que son adecuadas para la presente invención incluyen las derivadas de virus de polioma, o citomegalovirus (CMV) humano o murino y las repeticiones en tándem largas (LTR) de diversos retrovirus, tales como el virus de la leucemia murina, el virus del sarcoma murino o Rous, y el VIH. Véase Gluzman, Y. y Shenk, T., eds. (1983). "Enhancers and Eukaryotic Gene Expression", Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., que se incorpora en el presente documento por referencia..

También se pueden añadir secuencias de poliadenilación a las construcciones de expresión de la presente invención con el fin de aumentar la eficacia de la expresión de la fracción detectable. Se requieren dos elementos de

secuencia distintos para una poliadenilación precisa y eficaz: secuencias ricas en GU o U situadas cadena abajo del sitio de poliadenilación, y una secuencia altamente conservada de seis nucleótidos, en concreto, AAUAAA, situada de 11 a 30 nucleótidos cadena arriba del sitio. Las señales de terminación y poliadenilación adecuadas para la presente invención incluyen las derivadas de SV40.

Además de las realizaciones ya descritas, las construcciones de expresión de la presente invención pueden contener normalmente otros elementos especializados destinados a aumentar el nivel de expresión de ácidos nucleicos clonados o a facilitar la identificación de células que portan el ADN recombinante. Por ejemplo, una serie de virus animales contienen secuencias de ADN que potencian la replicación extracromosómica del genoma vírico en tipos de células permisivos. Los plásmidos que portan estos replicones virales se replican episomalmente siempre y cuando los factores apropiados sean proporcionados bien por genes portados sobre el plásmido o con el genoma de la célula hospedadora.

Las construcciones de expresión de la presente invención pueden o no incluir un replicón eucariota. Si está presente un replicón eucariota, el vector es capaz de la amplificación en células eucariotas usando el marcador seleccionable apropiado. Si la construcción no comprende un replicón eucariota, no es posible una amplificación episomal. En su lugar, el ADN recombinante se integra en el genoma de la célula diseñada, en el que el promotor dirige la expresión del ácido nucleico deseado.

La construcción de ácido nucleico puede introducirse en las células diana (por ejemplo, células neurogliales o células cardíacas) de la presente invención usando un vehículo/método apropiado de administración génica (transfección, transducción, etc.) y un sistema de expresión apropiado.

Los ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen, pero sin limitación, pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1 pNMT41 y pNMT81, que están disponibles en Invitrogen; pCI que está disponible en Promega; pMbac, pPbac, pBKRSV y pBK-CMV, que están disponibles en Strategene; pTRES que está disponible en Clontech, y sus derivados.

También se pueden usar vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus eucariotas tales como retrovirus. Los vectores de SV40 incluyen pSVT7 y pMT2, por ejemplo. Los vectores derivados del virus del papiloma bovino incluyen pBV-1MTHA, y los vectores derivados del virus Epstein-Barr incluyen pHEBO y p2O5. Otros vectores ilustrativos incluyen pMSG, pAV009/A⁺, pMTO10/A⁺, pMAMneo-5 y baculovirus pDSVE.

Pueden usarse sistemas basados en lípidos para la administración de estas construcciones a las células diana (por ejemplo, células neurogliales o células cardíacas) de la presente invención.

Los liposomas incluyen cualquier estructura sintética (es decir, no natural) compuesta de bicapas lipídicas, que encierran un volumen. Los liposomas incluyen emulsiones, espumas, micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, dispersiones de fosfolípidos, capas laminares y similares. Los liposomas se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. [Monkkonen, J. *et al.*, 1994, *J. Drug Target*, 2:299-308; Monkkonen, J. *et al.*, 1993, *Calcif. Tissue Int.*, 53:139-145; Lasic D. D., Liposomes Technology Inc., Elsevier, 1993, 63-105. (capítulo 3); Winterhalter M, Lasic D. D., *Chem Phys Lipids*, septiembre de 1993; 64(1-3):35-43].

Los liposomas pueden estar cargados positivamente, neutros o cargados negativamente. Para la captación del Sistema de Fagocitos Mononucleares (MPS), los liposomas pueden ser hidrófobos, ya que el enmascaramiento hidrófilo de la membrana liposómica (por ejemplo, mediante el uso de lípidos unidos a polietilenglicol y partículas hidrófilas) puede ser menos propenso a la captación de MPS. También es preferible que los liposomas no comprendan lípidos protegidos estéricamente tales como gangliósido-GM₁ y fosfatidilinositol, ya que estos lípidos previenen la captación de MPS.

Los liposomas pueden ser una sola capa lipídica o pueden ser multilaminares. Si el agente terapéutico es hidrófilo, su liberación puede mejorarse más usando vesículas unilaminares grandes debido a su mayor volumen interno. Por el contrario, si el agente terapéutico es hidrófobo, su administración puede mejorarse más usando vesículas multilaminares. Como alternativa, el agente terapéutico (por ejemplo, el oligonucleótido) puede no ser capaz de penetrar en la bicapa lipídica y, por consiguiente, permanecería adsorbido a la superficie del liposoma. En este caso, el aumento del área superficial del liposoma puede mejorar más la administración del agente terapéutico. Los liposomas adecuados de acuerdo con la invención son liposomas no tóxicos tales como, por ejemplo, los preparados a partir de fosfatidil-colina fosfoglicerol y colesterol. El diámetro de los liposomas usados puede variar de 0,1 a 1,0 micrómetros. Sin embargo, también se pueden usar otros intervalos de tamaños adecuados para la fagocitosis por parte de células fagocíticas. Para el calibrado de los liposomas, puede usarse la homogeneización, que se basa en la energía de cizalla para fragmentar los liposomas grandes en más pequeños. Los homogeneizadores que se pueden usar convenientemente incluyen microfluidizadores producidos por Microfluidics de Boston, MA. En un procedimiento de homogeneización típico, los liposomas se recirculan a través de un homogeneizador de emulsión convencional hasta que se observan tamaños de liposomas seleccionados. La distribución del tamaño de partícula se puede controlar mediante la diferenciación convencional del tamaño de partícula del haz láser. La extrusión de

liposomas a través de una membrana de policarbonato de poros pequeños o una membrana cerámica asimétrica es un método eficaz para reducir el tamaño de los liposomas a una distribución de tamaños relativamente bien definida. Por lo general, se hace circular la suspensión a través de la membrana una o más veces hasta que se logra la distribución del tamaño de liposoma deseada. Los liposomas pueden extruirse a través de membranas de poro sucesivamente menor para conseguir una reducción gradual del tamaño de los liposomas.

Se puede usar cualquier método conocido en la técnica para incorporar un agente polinucleotídico de microARN a un liposoma. Por ejemplo, el agente polinucleotídico de micro-ARN puede encapsularse dentro del liposoma. Como alternativa, puede adsorberse sobre la superficie del liposoma. Otros métodos que pueden usarse para incorporar un agente farmacéutico a un liposoma de la presente invención son los descritos por Alfonso et al., ["The science and practice of pharmacy", Mack Publishing, Easton Pa 19^a ed., (1995)] y los descritos por Kulkarni *et al.*, [*J. Microencapsul.* 1995, 12 (3) 229-46].

Los liposomas usados en los métodos de la presente invención atraviesan preferentemente las barreras sanguíneas. Por lo tanto, los liposomas de la presente invención preferentemente no comprenden un polisacárido dirigido a la barrera sanguínea (por ejemplo, manosa) en su parte de membrana. Preferentemente, los liposomas de la presente invención no comprenden péptidos en su parte de membrana que dirigen los liposomas a un receptor sobre una barrera sanguínea. Los ejemplos de dichos péptidos incluyen, pero sin limitación, transferrina, insulina, IGF-1, anticuerpo anti-receptor de transferrina IGF-2, anticuerpo anti-receptor de insulina, anticuerpo anti-receptor de IGF-1 y anticuerpo anti-receptor de IGF-2.

Con el fin de determinar liposomas que sean especialmente adecuados de acuerdo con la presente invención, se puede realizar un ensayo de detección tal como los ensayos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 20040266734 y la solicitud de patente de EE.UU. n.º 20040266734; y en Danenberg *et al.*, *Journal de cardiovascular pharmacology* 2003, 42:671-9; "Circulation" 2002, 106:599-605; "Circulation" 2003, 108:2798-804.

Otros vectores no basados en lípidos que se pueden usar de acuerdo con este aspecto de la presente invención incluyen, pero sin limitación, polilisina y dendrímeros.

La construcción de expresión también puede ser un virus. Los ejemplos de construcciones víricas incluyen, pero sin limitación, vectores adenovíricos, vectores retrovíricos, vectores víricos vaccinia, vectores víricos adeno-asociados, vectores víricos de polioma, vectores alfavíricos, vectores de rhabdovirus, vectores lentivíricos y vectores herpéticos.

Los vectores retrovíricos representan una clase de vectores particularmente adecuados para su uso con la presente invención. Los retrovirus defectuosos se usan habitualmente en la transferencia de genes a células de mamífero (para una revisión, véase Miller, A. D. (1990). *Blood* 76, 271). Se puede construir un retrovirus recombinante que comprenda los polinucleótidos de la presente invención usando técnicas moleculares bien conocidas. Pueden eliminarse partes del genoma retroviral para hacer defectuosa la maquinaria de replicación del retrovirus, y el retrovirus deficiente en la replicación puede envasarse en viriones, que pueden usarse para infectar células diana mediante el uso de un virus auxiliar, empleando técnicas convencionales. Los protocolos para producir retrovirus recombinantes y para infectar células con virus *in vitro* o *in vivo* se pueden encontrar, por ejemplo, en Ausubel *et al.* (1994) "Current Protocols in Molecular Biology" (Greene Publishing Associates, Inc. & John Wiley & Sons, Inc.). Se han usado retrovirus para introducir una variedad de genes en muchos tipos de células diferentes, incluyendo células neuronales, células epiteliales, células endoteliales, linfocitos, mioblastos, hepatocitos y células de médula ósea.

De acuerdo con una realización, se usa un vector lentivírico, un tipo de vector retroviral, de acuerdo con las presentes enseñanzas. Los vectores lentivíricos se usan ampliamente como vectores debido a su capacidad para integrarse en el genoma de las células que no se dividen, así como las que se dividen. El genoma vírico, en forma de ARN, se transcribe inversamente cuando el virus entra en la célula para producir ADN, que luego es insertado en el genoma en una posición aleatoria por la enzima integrasa vírica. El vector (un provirus) permanece en el genoma y se transmite a la progenie de la célula cuando se divide. Por razones de seguridad, los vectores lentivíricos nunca portan los genes necesarios para su replicación. Para producir un lentivirus, se transfectan varios plásmidos en una denominada estirpe celular de encapsulamiento, comúnmente HEK 293. Uno o más plásmidos, denominados generalmente plásmidos de encapsulamiento, codifican las proteínas de virión, tales como la cápside y la transcriptasa inversa. Otro plásmido contiene el material genético que va a ser suministrado por el vector. Se transcribe para producir el genoma vírico de ARN monocatenario, y está marcado por la presencia de la secuencia ψ (psi). Esta secuencia se usa para encapsular el genoma en el virión.

Un ejemplo específico de un vector lentivírico adecuado para introducir y expresar las secuencias polinucleotídicas de la presente invención en células neurogliales o células cardíacas es el vector de lentivirus pLKO.1.

Otro vector de expresión adecuado que puede usarse de acuerdo con este aspecto de la presente invención es el vector de adenovirus. El adenovirus es un vector de transferencia de genes ampliamente estudiado y usado habitualmente. Las principales ventajas de un vector de adenovirus incluyen una eficiencia de transducción relativamente alta de células que se dividen y quiescentes, un tropismo natural a una amplia selección de tejidos

epiteliales y una fácil producción de títulos altos (Russel, W. C. (2000) J Gen Virol 81, 57-63). El ADN de adenovirus es transportado al núcleo, pero no se integra en el mismo. Así pues, el riesgo de mutagénesis con vectores adenovíricos se minimiza, mientras que la expresión a corto plazo es particularmente adecuada para tratar células cancerosas. Los vectores adenovíricos usados en tratamientos experimentales contra el cáncer están descritos por Seth *et al.* (1999). "Adenoviral vectors for cancer gene therapy", pág. 103-120, P. Seth, ed., Adenoviruses: Basic Biology to Gene Therapy, Landes, Austin, TX).

Un vector de expresión vírico adecuado también puede ser un vector de adenovirus/retrovirus quimérico que combine componentes retrovíricos y adenovíricos. Dichos vectores pueden ser más eficaces que los vectores de expresión tradicionales para transducir células tumorales (Pan *et al.* (2002). *Cancer Letts* 184, 179-188).

Cuando se introducen las construcciones de expresión de la presente invención en células diana (por ejemplo, células neurogliales o células cardíacas) por infección vírica, la dosis vírica para la infección es de al menos 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} o más ufp o partículas víricas.

Independientemente del método o de la construcción que se emplee, se proporciona una célula aislada que comprende la construcción de ácido nucleico codificante de un microARN, como se ha detallado anteriormente.

Como se usa en el presente documento, el término "aislado" se refiere separado al menos parcialmente del entorno natural, por ejemplo, del cuerpo humano.

De acuerdo con una realización, se proporciona una célula aislada que comprende una construcción de ácido nucleico que expresa al menos un microARN o un precursor del mismo, en la que el microARN se selecciona del grupo que consiste en miR-135, miR-335, miR-15, miR-19, miR-26, miR-27, miR-181 y miR-182 bajo un control de la transcripción de un elemento regulador que actúa en *cis*.

De acuerdo con una realización específica, se proporciona una célula neuroglial aislada que comprende una construcción de ácido nucleico que expresa al menos un microARN o un precursor del mismo, en la que el microARN se selecciona del grupo que consiste en miR-135, miR-335, miR-26 y miR-182 bajo un control de la transcripción de un elemento regulador que actúa en *cis*.

De acuerdo con una realización específica, se proporciona una célula aislada que comprende una construcción de ácido nucleico que expresa un miR-19 o un precursor del mismo bajo un control de la transcripción de un elemento regulador que actúa en *cis*.

De acuerdo con una realización específica, se proporciona una célula aislada que comprende una construcción de ácido nucleico que expresa un miR-15 o un precursor del mismo bajo un control de la transcripción de un elemento regulador que actúa en *cis*.

De acuerdo con una realización específica, la célula es una célula neuroglial o una célula cardíaca.

De acuerdo con una realización específica, la célula neuroglial es una neurona tal como una neurona serotoninérgica.

Los microARN o precursores de los mismos deben proporcionarse a las células, es decir, a las células diana (por ejemplo, células neurogliales o células cardíacas) de la presente invención *in vivo* (es decir, dentro del organismo o del sujeto) o *ex vivo* (por ejemplo, en un cultivo tisular). En el caso de que las células se traten *ex vivo*, el método incluye preferentemente una etapa de administración de dichas células de nuevo a la terapia celular individual (*ex vivo*).

Para la terapia *ex vivo*, las células se tratan preferentemente con el agente de la presente invención (por ejemplo, un polinucleótido codificante de un microARN), tras lo que se administran al sujeto que las necesita.

La administración de las células tratadas *ex vivo* de la presente invención puede efectuarse usando cualquier vía de introducción adecuada, tal como vía intravenosa, intraperitoneal, intrarrenal, intragastrointestinal, subcutánea, transcutánea, intramuscular, intracutánea, intratecal, epidural y rectal. De acuerdo con realizaciones actualmente preferidas, las células tratadas *ex vivo* de la presente invención pueden introducirse en el individuo usando la administración intravenosa, intrarrenal, intragastrointestinal y/o intraperitoneal.

Las células de la presente invención (por ejemplo, células neurogliales o células cardíacas) pueden derivarse de fuentes autólogas o de fuentes alogénicas tales como cadáveres o donantes humanos. Dado que las células no autólogas son propensas a inducir una reacción inmune cuando se administran al organismo, se han desarrollado varias metodologías para reducir la probabilidad de rechazo de células no autólogas. Estas incluyen la supresión del sistema inmunitario del receptor o la encapsulación de las células no autólogas en membranas semipermeables, inmunoisolantes, antes del trasplante.

Las técnicas de encapsulación se clasifican, en general, como microencapsulación, que implica vehículos esféricos pequeños, y macroencapsulación, que implica membranas de lámina plana y de fibra hueca mayores (Uludag, H. *et al.* (2000). "Technology of mammalian cell encapsulation". *Adv Drug Deliv Rev* 42, 29-64).

Los métodos de preparación de microcápsulas son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, los develados en: Lu, M. Z. *et al.* (2000). "Cell encapsulation with alginate and alpha-phenoxycinnamylidene-acetylated poly(allylamine)". *Biotechnol Bioeng* 70, 479-483; Chang, T. M. y Prakash, S. (2001) "Procedures for microencapsulation of enzymes, cells and genetically engineered microorganisms". *Mol Biotechnol* 17, 249-260; y Lu, M. Z., *et al.* (2000). "A novel cell encapsulation method using photosensitive poly(allylamine alpha-cyanocinnamylideneacetate)". *J Microencapsul* 17, 245-521.

Por ejemplo, las microcápsulas se preparan usando colágeno modificado en un complejo con una envoltura de terpolímero de metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA), ácido metacrílico (MAA) y metacrilato de metilo (MMA), produciendo un espesor de cápsula de 2-5 µm. Dichas microcápsulas pueden encapsularse además con otros 2 a 5 µm de envoltura de terpolímero con el fin de conferir una superficie lisa cargada negativamente y minimizar la absorción de la proteína plasmática (Chia, S. M. *et al.* (2002). "Multi-layered microcapsules for cell encapsulation". *Biomaterials* 23, 849-856).

Otras microcápsulas se basan en alginato, un polisacárido marino (Sambanis, A. (2003). "Encapsulated islets in diabetes treatment". *Diabetes Thechnol Ther* 5, 665-668), o sus derivados. Por ejemplo, las microcápsulas se pueden preparar mediante la complejación de polielectrólitos entre los polianiones alginato de sodio y sulfato sódico de celulosa y el polication clorhidrato de poli(metilen-co-guanidina) en presencia de cloruro de calcio.

Se apreciará que la encapsulación celular se mejora cuando se usan cápsulas más pequeñas. Así pues, por ejemplo, el control de calidad, la estabilidad mecánica, las propiedades de difusión y las actividades *in vitro* de las células encapsuladas mejoraron cuando el tamaño de la cápsula se redujo de 1 mm a 400 µm (Canaple, L. *et al.* (2002). "Improving cell encapsulation through size control". *J Biomater Sci Polym Ed* 13, 783-96). Además, se descubrió que las biocápsulas nanoporosas con un tamaño de poro bien controlado de tan solo 7 nm, las químicas de superficie adaptadas y las microarquitecturas precisas inmunoaislaron con éxito los microambientes de las células (véase Williams, D. (1999). "Small is beautiful: microparticle and nanoparticle technology in medical devices". *Med Device Technol* 10, 6-9; y Desai, T. A. (2002). "Microfabrication technology for pancreatic cell encapsulation". *Expert Opin Biol Ther* 2, 633-646).

Los ejemplos de agentes inmunosupresores que pueden usarse junto con el tratamiento *ex vivo* incluyen, pero sin limitación, metotrexato, ciclofosfamida, ciclosporina, ciclosporina A, cloroquina, hidroxiclороquina, sulfasalazina (sulfasalazopirina), sales de oro, D-penicilamina, leflunomida, azatioprina, anakinra, infliximab (REMICADE®), etanercept, bloqueadores de TNFα, un agente biológico que se dirige a una citoquina inflamatoria y un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE). Los ejemplos de AINE incluyen, pero sin limitación, ácido acetilsalicílico, salicilato de colina y magnesio, diflunisal, salicilato de magnesio, salsalato, salicilato sódico, diclofenaco, etodolac, fenoprofeno, flurbiprofeno, indometacina, cetoprofeno, ceterolaco, meclofenamato, naproxeno, nabumetona, fenilbutazona, piroxicam, sulindac, tolmetina, acetaminofén, ibuprofeno, inhibidores de Cox-2 y tramadol.

Para la terapia *in vivo*, el agente (por ejemplo, un polinucleótido que codifica un microARN) se administra al sujeto en sí o como parte de una composición farmacéutica. Preferentemente, dichas composiciones se formulan para permitir el paso a través de la barrera hematoencefálica (BHE).

Las metodologías convencionales para la administración de fármacos al sistema nervioso central (SNC) incluyen: estrategias neuroquirúrgicas (por ejemplo, inyección intracerebral o infusión intracerebroventricular); la manipulación molecular del agente (por ejemplo, la producción de una proteína de fusión quimérica que comprende un péptido de transporte que tiene una afinidad para una molécula de superficie celular endotelial en combinación con un agente que es incapaz de atravesar la BHE) en un intento de aprovechar una de las vías de transporte endógenas de la BHE; estrategias farmacológicas diseñadas para aumentar la solubilidad lipídica de un agente (por ejemplo, conjugación de agentes hidrosolubles con vehículos de lípidos o colesterol); y la interrupción transitoria de la integridad de la BHE por alteración hiperosmótica (resultante de la infusión de una solución de manitol en la arteria carótida o el uso de un agente biológicamente activo tal como un péptido de angiotensina).

Los métodos de administración de fármacos detrás de la BHE incluyen la implantación intracerebral (tal como con agujas) y la distribución potenciada por convección. Se puede usar manitol para evitar la BHE. Igualmente, se puede usar la administración mucosal (por ejemplo, nasal) para evitar la BHE.

Los agentes polinucleótidos de micro-ARN de la presente invención también se pueden administrar a un organismo en una composición farmacéutica en la que se mezcla con vehículos o excipientes adecuados.

Como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" se refiere a un preparado de uno o más de los principios activos descritos en el presente documento con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En el presente documento, la expresión "principio activo" se refiere al péptido responsable del efecto biológico.

De aquí en adelante, las expresiones "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable", que pueden usarse indistintamente, se refieren a un vehículo o diluyente que no causa irritación significativa a un organismo ni anula la actividad biológica ni las propiedades del compuesto administrado. Un adyuvante se incluye en estas expresiones.

En el presente documento, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar además la administración de un principio activo. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato cálcico, fosfato cálcico, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Las técnicas para la formulación y administración de fármacos se pueden encontrar en "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición, que se incorpora en el presente documento por referencia.

Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, la administración oral, rectal, transmucosa, en especial, transnasal, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como inyecciones intratecal, intraventricular directa, intravenosa, intraperitoneal, intranasal o intraocular.

Como alternativa, se puede administrar la composición farmacéutica de una manera local en vez de sistémica, por ejemplo, mediante la inyección de la composición farmacéutica directamente en una región tisular de un paciente.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden fabricar mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la presente invención se pueden formular así de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprendan excipientes y adyuvantes que faciliten el procesamiento de los principios activos en preparaciones que puedan usarse farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración seleccionada.

Para la inyección, los principios activos de la composición farmacéutica se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosa, se usan, en la formulación, penetrantes apropiados para la barrera que se vaya a traspasar. Dichos penetrantes se conocen en general en la técnica.

Para la administración oral, la composición farmacéutica se puede formular fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten que la composición farmacéutica sea formulada como comprimidos, pastillas, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para la ingestión oral por un paciente. Los preparados farmacológicos para su uso oral se pueden hacer usando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir los adyuvantes adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparados de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carbometilcelulosa sódica; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes desintegrantes tales como polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio.

Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados. Para este fin, se pueden usar soluciones de azúcar concentradas que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para su identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

Las composiciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los principios activos en mezcla con cargas tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizantes. En las cápsulas blandas, los principios activos pueden disolverse o suspenderse en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para la administración oral deben estar a dosis adecuadas para la vía de administración seleccionada.

Para la administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de comprimidos o pastillas formuladas de manera convencional.

Para la administración por inhalación nasal, los principios activos para su uso de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en forma de una presentación de pulverización en aerosol de un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dicloro-tetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad dosificada. Las cápsulas y los cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un dispensador pueden formularse para que contengan una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

La composición farmacéutica descrita en el presente documento puede formularse para la administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis con, opcionalmente, un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión.

Las composiciones farmacéuticas para la administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma hidrosoluble. Además, las suspensiones de los principios activos pueden prepararse como suspensiones para inyección oleosas o a base de agua apropiadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones de inyección acuosas pueden contener sustancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión puede contener también estabilizantes o agentes adecuados que aumenten la solubilidad de los principios activos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Como alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo para su constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, solución estéril, sin pirógenos, a base de agua, antes de su uso

La composición farmacéutica de la presente invención también se puede formular en composiciones rectales tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ejemplo, bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el fin pretendido. Más concretamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de principios activos (péptidos) eficaz para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de un trastorno (por ejemplo, diabetes) o prolongar la supervivencia del sujeto que se está tratando.

De acuerdo con una realización de la presente invención, la sobreexpresión de miR-135 tiene un efecto antidepresivo.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz es competencia de los expertos en la materia, en especial, a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Para cualquier preparado usado en los métodos de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro* y de cultivo celular. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para conseguir una concentración o un título deseado. Dicha información se puede usar para determinar con mayor precisión dosis útiles en seres humanos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los principios activos descritos en el presente documento pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales *in vitro*, en cultivos celulares o animales experimentales. Los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y de cultivos celulares y estudios en animales se pueden usar para formular una selección de dosis para su uso en seres humanos. La dosis puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosis pueden ser escogidas por cada médico en vista del estado del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl *et al.*, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Capítulo 1 pág.1).

La cantidad y el intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles en plasma suficientes del principio activo para inducir o suprimir el efecto biológico (concentración eficaz mínima, MEC). La MEC variará para cada preparación, pero puede estimarse a partir de datos *in vitro*. Las dosis necesarias para lograr la MEC dependerán de las características individuales y de la vía de administración. Se pueden usar ensayos de detección para determinar las concentraciones en plasma.

Dependiendo de la gravedad y de la capacidad de respuesta de la afección que se vaya a tratar, la dosis puede ser de una sola o varias administraciones, con un curso de tratamiento de varios días a varias semanas o hasta que se produzca la curación o se consiga una disminución del estado patológico.

- 5 Como es evidente, la cantidad de una composición que se va a administrar dependerá del sujeto que se esté tratando, de la gravedad de la afección, de la forma de administración, del juicio del médico que la prescribe, etc. La dosis y el momento de la administración serán sensibles a un control cuidadoso y continuo del estado variable individual.
- 10 Se apreciará que existen modelos animales mediante los que se pueden ensayar los agentes de la presente invención antes del tratamiento de los seres humanos. Por ejemplo, se pueden usar modelos animales de depresión, estrés, ansiedad tales como el modelo de desamparo aprendido (LH), modelo de estrés leve crónico (CMS), modelo de estrés de rechazo social (SDS) y el modelo de privación materna.
- 15 Las composiciones de la presente invención se pueden presentar, si se desea, en un envase o en un dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitarias que contienen el principio activo. El envase puede comprender, por ejemplo, papel metálico o de plástico, tal como un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dispensador también se puede acomodar mediante una notificación asociada con el envase en una
- 20 forma prescrita por un organismo gubernamental que regule la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos, notificación que refleje la aprobación por parte del organismo de la forma de las composiciones, o de la administración a seres humanos o animales. Dicha notificación, por ejemplo, puede ser de un etiquetado aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos para fármacos de prescripción médica o de un prospecto de producto aprobado. Las composiciones que comprenden un preparado de la invención
- 25 formulado en un vehículo farmacéutico compatible también pueden prepararse, colocarse en un recipiente apropiado y etiquetarse para el tratamiento de una afección indicada, como se detalla mejor anteriormente.

Se apreciará que las composiciones terapéuticas de la invención pueden comprender, además de los agentes polinucleotídicos de microARN, otros medicamentos conocidos para el tratamiento de la depresión, el estrés, la

30 ansiedad, la privación del sueño, etc., tales como, pero sin limitación, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI), inhibidores de la recaptación de serotonina-norepinefrina (SNRI), antidepresivos serotoninérgicos noradrenérgicos y específicos (NaSSA), inhibidores de la recaptación de norepinefrina (noradrenalina) (NRI), inhibidores de la recaptación de noradrenalina-dopamina, potenciadores selectivos de la recaptación de serotonina, desinhibidores de norepinefrina-dopamina, antidepresivos tricíclicos (por ejemplo, imipramina), inhibidores de la

35 monoaminooxidasa (MAOI). Estos medicamentos pueden incluirse en el artículo de fabricación en un solo envase o en envases separados.

Los presentes inventores han demostrado que la sobreexpresión de miR-27 produce la supresión de MaOA (véase el Ejemplo 1, más adelante), la sobreexpresión de miR-135 produce la supresión de Slc6a4 (véase el Ejemplo 1,

40 más adelante), la sobreexpresión de miR-135, miR-335, miR-26, miR-181 o miR-182 produce la supresión de Htr1a (véase el Ejemplo 1, más adelante), la sobreexpresión de miR-19 produce la supresión de Adr1 (véase el Ejemplo 2 a continuación) y en la supresión de CB1 (véase el Ejemplo 3B, más adelante), y que la sobreexpresión de miR-15 produce la supresión de Crh1R (véase el Ejemplo 4, más adelante) y en supresión de FKBP5 (véase el Ejemplo 4B,

45 más adelante).

Así pues, de acuerdo con una realización de la presente divulgación, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen transportador de serotonina (Slc6a4) en una célula neuroglial, comprendiendo el método la

50 modulación de una actividad o expresión de un microARN o un precursor del mismo, en el que el microARN se selecciona del grupo que consiste en miR-135 y miR-335.

Como se usa en el presente documento, la expresión "transportador de serotonina (Slc6a4)" se refiere a la proteína transportadora de monoamina (también denominada SERT) que participa en la recaptación de la serotonina de la hendidura sináptica. Un ejemplo de Slc6a4 se expone en NP_001036.1.

55 De acuerdo con otra realización, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen de receptor inhibidor de la serotonina 1a (Htr1a) en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un microARN o un precursor del mismo en la célula neuroglial, en el que el microARN se selecciona del grupo que consiste en miR-135 y miR-335, miR-181, miR-182 y miR-26.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "receptor inhibidor de la serotonina 1a (Htr1a)" se refiere al receptor acoplado a proteína G que funciona como un autorreceptor en la neurona presináptica y a la inhibición mediada de la liberación de serotonina. Un Htr1a ilustrativo se expone en NP_000515.2.

De acuerdo con otra realización, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen de monoamina hidroxilasa (MaoA) en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o

65 expresión de un miR-27 o un precursor del mismo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "monoamina hidroxilasa (MaoA)" se refiere a la enzima que degrada los neurotransmisores de amina, tales como la dopamina, la norepinefrina y la serotonina. Un ejemplo de MaoA se expone en NP_000231.1.

5 De acuerdo con una realización de la presente divulgación, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen de triptófano hidroxilasa 2 (Tph2) en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un microARN o un precursor del mismo en la célula neuroglial, en la que el microARN se selecciona del grupo que consiste en miR-181 y miR27.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "triptófano hidroxilasa 2 (Tph2)" se refiere a la enzima que cataliza la primera etapa y la etapa limitante de la velocidad en la biosíntesis de serotonina. Se expone una Tph2 ilustrativa en NP_NP_775489.2.

15 De acuerdo con otra realización, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen del receptor beta adrenérgico 1 (Adrb1) en una célula neuroglial o célula cardíaca, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un miR-19 o un precursor del mismo.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "receptor beta adrenérgico 1 (Adrb1)" se refiere al receptor que media los efectos fisiológicos de la adrenalina y la noradrenalina. Un ejemplo de Adrb1 se expone en NP_000675.1.

De acuerdo con otra realización, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen del receptor beta adrenérgico 2 (Adrb2) en una célula neuroglial o célula cardíaca, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un miR-15 o un precursor del mismo.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "receptor beta adrenérgico 2 (Adrb2)" se refiere al receptor que está directamente asociado con el canal de calcio de tipo L de clase C Ca(V)_{1.2}. Adrb2 se expone, por ejemplo, en NP_000015.1.

30 De acuerdo con otra realización, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen receptor de CRH de tipo 1 en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un miR-15 o un precursor del mismo.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "CRH de tipo 1" se refiere al receptor que se une a la hormona liberadora de corticotropina (CRH). La CRH de tipo 1 se expone, por ejemplo, en NP_001138618.1, NP_001138619.1, NP_001138620.1 y NP_004373.2.

40 De acuerdo con otra realización, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen de receptor de glutamato en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un miR-181 o un precursor del mismo.

45 De acuerdo con otra realización, el gen del receptor de glutamato comprende el receptor de glutamato metabotrópico 1 (Grm1), receptor de glutamato ionotrópico, kainato 3 (Grik3), receptor de glutamato metabotrópico 5 (Grm5), receptor de glutamato ionotrópico kainato 2 (Grik2) y receptor de glutamato metabotrópico 7 (Grm7), como se describe más detalladamente anteriormente.

De acuerdo con otra realización, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen de la molécula de adhesión celular del síndrome de Down (Dscam) en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un miR-182 o un precursor del mismo.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de adhesión celular del síndrome de Down (Dscam)" se refiere a la molécula de adhesión celular que desempeña un papel en la autoevolución neuronal. Dscam se expone, por ejemplo, en NP_001380.2.

55 De acuerdo con otra realización, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen de la molécula de adhesión celular L1 (L1cam) en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un miR-182 o un precursor del mismo.

60 Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de adhesión celular L1 (L1cam)" se refiere a la molécula de adhesión celular neuronal. L1cam se expone, por ejemplo, en NP_000416.1, NP_001137435.1, NP_076493.1.

De acuerdo con otra realización, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen de la proteína X asociada a Translin (Tsnax) en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un miR-182 o un precursor del mismo.

65

Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína X asociada a Translin (Tsnax)" se refiere a la proteína que interactúa específicamente con translin. Tsnax se expone, por ejemplo, en NP_005990.1.

De acuerdo con otra realización, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen del receptor canabinoide 1 (CB1) en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un miR-19 o un precursor del mismo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "receptor canabinoide 1 (CB1)" se refiere al receptor de membrana celular (también conocido como CNR1). CB1 se expone, por ejemplo, en NP_001153698.1, NP_001153730.1, NP_001153731.1, NP_057167.2, NP_149421.2.

De acuerdo con otra realización, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen de la proteína 5 de unión a FK506 (FKBP5) en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un miR-15 o un precursor del mismo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína 5 de unión a FK506 (FKBP5)" se refiere a la proteína que se une específicamente a los inmunosupresores FK506 y rapamicina. FKBP5 se expone, por ejemplo, en NP_001139247.1, NP_001139248.1, NP_001139249.1, NP_004108.1.

De acuerdo con otra realización, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen de sintaxina 1a (Stx1a) en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un miR-15 o un precursor del mismo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sintaxina 1a (Stx1a)" se refiere a la proteína específica del sistema nervioso. Stx1a se expone, por ejemplo, en NP_001159375.1, NP_004594.1.

De acuerdo con otra realización, se proporciona un método de regulación de una expresión de un gen de quinasa regulada por suero/glucocorticoide (Sgk1) en una célula neuroglial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o expresión de un miR-15 o un precursor del mismo.

Como se usa en el presente documento, la expresión "quinasa regulada por suero/glucocorticoide (Sgk1)" se refiere a proteína quinasa serina/treonina. Sgk1 se expone, por ejemplo, en NP_001137148.1, NP_001137149.1, NP_001137150.1, NP_005618.2.

Las presentes enseñanzas contemplan la regulación por aumento (es decir, el aumento) o la regulación por disminución (es decir, la disminución) de los niveles de expresión de los genes anteriormente mencionados.

La regulación por disminución de la expresión génica de acuerdo con las presentes enseñanzas normalmente se lleva a cabo administrando o expresando en las células diana (por ejemplo, célula neuroglial o célula cardíaca) un polinucleótido de microARN (como se describe con más detalle con anterioridad).

De acuerdo con una realización específica, cuando la regulación comprende la regulación por disminución de la expresión del gen Slc6a4, la modulación comprende la regulación por aumento del miR-135 y/o miR-335.

De acuerdo con una realización específica, cuando la regulación comprende la regulación por disminución de la expresión del gen Htr1a, la modulación comprende la regulación por aumento del miR-135, miR-335, miR-181, miR-182 y/o miR-26.

De acuerdo con una realización específica, cuando la regulación comprende la regulación por disminución de la expresión del gen MaoA, la modulación comprende la regulación por aumento del miR-27.

De acuerdo con una realización específica, cuando la regulación comprende la regulación por disminución de la expresión del gen Adrb1, la modulación comprende la regulación por aumento del miR-19.

De acuerdo con una realización específica, cuando la regulación comprende la regulación por disminución de la expresión del gen del receptor de CRH de tipo 1, la modulación comprende la regulación por aumento del miR-15.

De acuerdo con una realización específica, cuando la regulación comprende la regulación por disminución de la expresión del gen CB1, la modulación comprende la regulación por aumento del miR-19.

De acuerdo con una realización específica, cuando la regulación comprende la regulación por disminución de la expresión del gen FKBP5, la modulación comprende la regulación por aumento del miR-15.

Como alternativa, de acuerdo con otra realización de la presente divulgación, la regulación por aumento de la expresión génica se afecta administrando o expresando en las células diana (por ejemplo, célula neuroglial o célula cardíaca) un agente capaz de regular por disminución una expresión de un microARN.

La regulación por disminución de los microARN puede efectuarse a nivel genómico y/o de transcripción usando una variedad de moléculas que interfieran con la transcripción y/o en la traducción (por ejemplo, agentes silenciadores de ARN, Ribozima, DNzyme y antisentido).

5 En la técnica, se conocen métodos de regulación por disminución de la expresión de microARN.

Los agentes de ácido nucleico que regulan por disminución la actividad de miR incluyen, pero sin limitación, un diana mimética, un gen resiliente a microARN y un inhibidor de miARN.

10 La diana mimética o la diana resiliente al micro-ARN son esencialmente complementarias al microARN siempre que se permitan uno o más de los siguientes desapareamientos:

(a) un desapareamiento entre el nucleótido del extremo 5' del microARN y la secuencia de nucleótidos correspondiente de la diana mimética o diana resiliente al micro-ARN;

15 (b) un desapareamiento entre uno cualquiera de los nucleótidos de la posición 1 a la posición 9 del microARN y la secuencia de nucleótidos correspondiente de la diana mimética o diana resiliente al micro-ARN; o

(c) tres desapareamientos entre uno cualquiera de los nucleótidos de la posición 12 a la posición 21 del microARN y la secuencia de nucleótidos correspondiente de la diana mimética o diana resiliente al micro-ARN, siempre que no haya más de dos desapareamientos consecutivos.

20 El ARN de diana mimética es esencialmente similar al ARN diana modificado para volverlo resiliente a la escisión inducida por el miARN, por ejemplo, mediante la modificación de su secuencia de manera que se introduzca una variación en el nucleótido de la secuencia diana complementaria a los nucleótidos 10 u 11 del miARN producido como consecuencia del desapareamiento.

25 Como alternativa, se puede implementar una diana resiliente al microARN. Por lo tanto, se puede introducir una mutación silenciosa en el sitio de unión al microARN del gen diana de manera que el ADN y las secuencias de ARN resultantes se cambien de una manera que impida la unión del microARN, pero la secuencia de aminoácidos de la proteína no se modifique. Por lo tanto, se puede sintetizar una nueva secuencia en lugar del sitio de unión existente, en la que se cambie la secuencia de ADN, produciendo la falta de unión del miARN a su diana.

30 De acuerdo con una realización específica, la diana mimética o la diana resiliente al micro-RNA está unida al promotor asociado de manera natural con el pre-miARN que reconoce el gen diana y se introduce en la célula vegetal. De esta manera, el ARN de diana mimética de miARN o de diana resiliente al micro-ARN se expresará en las mismas circunstancias que el miARN, y el ARN de diana mimética o de diana resiliente al microARN sustituirá al ARN de diana no mimética/de diana resiliente al micro-ARN degradado por la escisión inducida por el miARN.

35 Los alelos de miARN no funcionales o genes diana resilientes al miARN también se pueden introducir por recombinación homóloga para sustituir los alelos codificantes del miARN o los genes diana sensibles al miARN.

40 La expresión recombinante se efectúa mediante la clonación del ácido nucleico de interés (por ejemplo, miARN, gen diana, agente silenciador, etc.) en una construcción de expresión de ácido nucleico bajo la expresión de un promotor vegetal.

45 En otras realizaciones de la divulgación, se usan ácidos nucleicos monocatenarios sintéticos como inhibidores de miARN. Un inhibidor de miARN normalmente tiene entre aproximadamente 17 a 25 nucleótidos de longitud y comprende una secuencia 5' a 3' que es al menos un 90 % complementaria a la secuencia 5' a 3' de un miARN maduro. En ciertas realizaciones, una molécula inhibidora de miARN tiene una longitud de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos, o cualquier intervalo derivable de la misma. Además, un inhibidor de miARN tiene una secuencia (de 5' a 3') que es o es al menos un 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 50 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 o 100 % complementaria, o cualquier intervalo derivable de la misma, a la secuencia 5' a 3' de un miARN maduro, en particular, un miARN natural maduro.

55 Los inhibidores de miARN pueden ponerse en contacto con las células usando técnicas de transfección transitoria. Los inhibidores de miARN se pueden adquirir en compañías como Applied Biosystems.

60 Como alternativa, los inhibidores de miARN pueden ser parte de un vector de expresión, como se describe anteriormente en el presente documento. En este caso, las células pueden ser transitoria o establemente transfectadas con el vector.

De acuerdo con una realización específica, cuando la regulación comprende la regulación por aumento de la expresión del gen Tph2, la modulación comprende la regulación por disminución del miR-181 y/o miR-27.

65 De acuerdo con una realización, la regulación por disminución de la expresión de un microARN se efectúa mediante el uso de una secuencia de ácido nucleico que se une y regula por disminución específicamente la expresión del microARN. Una secuencia de ácido nucleico ilustrativa que se puede usar de acuerdo con la presente invención

puede adquirirse de cualquier fabricante como, por ejemplo, de Genecopoeia (miArrest, inhibidores basados en vector de microARN).

Por lo tanto, de acuerdo con otra realización, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico para regular por disminución una expresión de miR-181, miR-182, miR-26, miR-27, miR-135, miR-335, miR-15 y miR-19 o un precursor del mismo.

Los ejemplos de polinucleótidos que se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación para regular por disminución la expresión de miR-181 incluyen, pero sin limitación, los establecidos en SEQ ID NO: 134-137 y SEQ ID NO: 154-157.

Los ejemplos de polinucleótidos que se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación para regular por disminución la expresión de miR-182 incluyen, pero sin limitación, los establecidos en SEQ ID NO: 138-141 y SEQ ID NO: 147.

Los ejemplos de polinucleótidos que se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación para regular por disminución la expresión de miR-26 incluyen, pero sin limitación, los establecidos en SEQ ID NO: 126-129 y SEQ ID NO: 145-146.

Los ejemplos de polinucleótidos que se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación para regular por disminución la expresión de miR-27 incluyen, pero sin limitación, los establecidos en SEQ ID NO: 130-133 y SEQ ID NO: 152-153.

Los ejemplos de polinucleótidos que se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación para regular por disminución la expresión de miR-135 incluyen, pero sin limitación, los establecidos en SEQ ID NO: 110-113 y SEQ ID NO: 142-143.

Los ejemplos de polinucleótidos que se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación para regular por disminución la expresión de miR-335 incluyen, pero sin limitación, los establecidos en SEQ ID NO: 114-117 y SEQ ID NO: 144.

Los ejemplos de polinucleótidos que se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación para regular por disminución la expresión de miR-15 incluyen, pero sin limitación, los establecidos en SEQ ID NO: 118-121 y SEQ ID NO: 150-151.

Los ejemplos de polinucleótidos que se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación para regular por disminución la expresión de miR-19 incluyen, pero sin limitación, los establecidos en SEQ ID NO: 122-125 y SEQ ID NO: 148-149.

Dichas secuencias de ácido nucleico pueden estar comprendidas además en un vector de expresión como se describe con más detalle anteriormente.

La presente invención contempla además la evaluación de la expresión del gen diana (por ejemplo, transcripción o polipéptido) tras la regulación por disminución o la regulación por aumento del nivel de microARN en la célula (por ejemplo, célula neuroglial o célula cardíaca).

Así pues, se puede determinar la presencia y/o el nivel de secuencia de ácido nucleico de un gen diana (por ejemplo, Slc6a4, Htr1a, MaoA, Adrb1, Adrb2, receptor de CRH de tipo 1, CB1, FKBP5, Tph2, Grm1, Grik3, Grm5, Grik2, Grm7, Gria2, Dscam, L1cam, Tsnax, Sgk1 y/o Stx1a) (por ejemplo, transcripción) usando un polinucleótido aislado (por ejemplo, una sonda de polinucleótido, una sonda/un cebador de oligonucleótido) capaz de hibridarse a una secuencia de ácido nucleico de un gen diana (por ejemplo, Slc6a4 según lo expuesto, por ejemplo, en NM_001045.4 o una de sus partes; Htr1a según lo expuesto, por ejemplo, en NM_000524.3 o una de sus partes; MaoA según lo expuesto, por ejemplo, en NM_000240.3 o NM_001270458.1 o una de sus partes; Adrb1 según lo expuesto, por ejemplo, en NM_000684.2 o una de sus partes; Adrb2 según lo expuesto, por ejemplo, en NM_000024.5 o una de sus partes; receptor de CRH de tipo 1 según lo expuesto, por ejemplo, en NM_001145146.1, NM_001145147.1 o una de sus partes; CB1 según lo expuesto, por ejemplo, en NM_001160226.1, NM_033181.3 o una de sus partes; FKBP5 según lo expuesto, por ejemplo, en NM_001145775.1, NM_001145777.1 o una de sus partes; Tph2 según lo expuesto, por ejemplo, en NM_173353.3 o una de sus partes; Grm1 según lo expuesto, por ejemplo, en NM_000838.3, NM_001114329.1 o una de sus partes; Grik3 según lo expuesto, por ejemplo, en NM_000831.3 o una de sus partes; Grm5 según lo expuesto, por ejemplo, en NM_000842.3, NM_001143831.2 o una de sus partes; Grik2 según lo expuesto, por ejemplo, en NM_001166247.1, NM_021956.4 o una de sus partes; Grm7 según lo expuesto, por ejemplo, en NM_000844.3, NM_181874.2 o una de sus partes; Gria2 según lo expuesto, por ejemplo, en NM_000826.3, NM_001083619.1 o una de sus partes; Dscam según lo expuesto, por ejemplo, en NM_001389.3 o una de sus partes; L1cam según lo expuesto, por ejemplo, en NM_000425.3, NM_001143963.1, NM_024003.2 o una de sus partes; Tsnax según lo expuesto, por ejemplo, en NM_005999.2 o una de sus partes; Sgk1 según lo expuesto, por ejemplo, en NM_001143676.1, NM_001143677.1, NM_001143678.1

o una de sus partes y/o Stx1a según lo expuesto, por ejemplo, en NM_001165903.1, NM_004603.3 o una de sus partes). Dicho polinucleótido puede ser de cualquier tamaño, tal como un polinucleótido corto (por ejemplo, de 15-200 bases), y un polinucleótido intermedio (por ejemplo, 200-2.000 bases) o un polinucleótido largo mayor, de 2.000 bases

La sonda polinucleotídica aislada usada por la presente divulgación puede ser cualquier molécula de ARN marcada directa o indirectamente (por ejemplo, oligonucleótido de ARN, una molécula de ARN transcrito *in vitro*), molécula de ADN (por ejemplo, oligonucleótido, molécula de ADNc, molécula genómica) y/o un análogo [por ejemplo, ácido peptidonucleico (PNA)] que sea específico de la transcripción de ARN del gen diana de la presente divulgación.

Los oligonucleótidos diseñados de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención pueden generarse de acuerdo con cualquier método de síntesis de oligonucleótidos conocido en la técnica, como se describe con detalle en lo que antecede.

El oligonucleótido de la presente divulgación es de al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 22, al menos 25, al menos 30 o al menos 40 bases que se pueden hibridar específicamente con alteraciones de secuencia descritas anteriormente.

Los oligonucleótidos de la presente divulgación pueden comprender nucleósidos heterocíclicos que consisten en bases purínicas y pirimidínicas, unidas en un enlace fosfodiéster 3' a 5'.

Preferentemente, los oligonucleótidos usados son los modificados bien en la cadena principal, los enlaces internucleósidos o las bases, como se ha descrito ampliamente con anterioridad.

El polinucleótido aislado usado por la presente divulgación puede marcarse bien directa o indirectamente usando una molécula de marcaje. Dichos marcadores pueden ser, por ejemplo, moléculas fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína o Rojo Texas), molécula radiactiva (por ejemplo, ^{32}P - γ -ATP o ^{32}P - α -ATP) y sustratos cromogénicos.

[por ejemplo, Fast Red, BCIP/INT, disponible en (ABCAM, Cambridge, MA)]. El marcaje directo puede realizarse conjugando covalentemente una molécula de marcaje con el polinucleótido (por ejemplo, usando síntesis en fase sólida) o mediante incorporación a través polimerización (por ejemplo, usando una reacción de transcripción *in vitro* o marcaje con cebado aleatorio). El marcaje indirecto puede realizarse conjugando o incorporando covalentemente al polinucleótido una molécula de marcaje no marcada (por ejemplo, Digoxigenina o biotina) y sometiendo posteriormente el polinucleótido a una molécula marcada (por ejemplo, anticuerpo anti-Digoxigenina o estreptavidina) capaz de reconocer específicamente el marcador no marcado.

Los polinucleótidos descritos anteriormente pueden emplearse en una variedad de métodos de detección de ARN tales como análisis de transferencia de Northern, PCR (RT-PCR) transcrita inversamente [por ejemplo, una RT-PCR semi-cuantitativa, RT-PCR cuantitativa usando, por ejemplo, el Light Cycler™ (Roche), hibridación *in situ* de ARN (ARN-ISH), tinción de RT-PCR *in situ*] [por ejemplo, como se describe en Nuovo G. J., *et al.* 1993, "Intracellular localization of polymerase chain reaction (PCR)-amplified hepatitis C cDNA". *Am J Surg Pathol.* 17: 683-90, y Komminoth P., *et al.* 1994, "Evaluation of methods for hepatitis C virus detection in archival liver biopsies"; comparación de histología, inmunohistoquímica, hibridación *in situ*, reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR) y RT-PCR *in situ*. *Pathol Res Pract*, 190: 1017-25] y análisis de micromatrices de oligonucleótidos [por ejemplo, usando la micromatriz Affymetrix (Affymetrix®, Santa Clara, CA)].

La presencia y/o el nivel de la secuencia de aminoácidos del gen diana (por ejemplo, Slc6a4, Htr1a, MaoA, Adb1, Adb2, receptor de CRH de tipo 1, CB1, FKBP5, Tph2, Grm1, Grik3, Grm5, Grik2, Grm7, Gria2, Dscam, L1cam, Tsnax, Sgk1 y/o Stx1a) (por ejemplo, proteína) se puede determinar usando, por ejemplo, un anticuerpo específico mediante la formación de un inmunocomplejo [es decir, un complejo formado entre el antígeno del gen diana (una secuencia de aminoácidos) presente en la muestra biológica y el anticuerpo específico].

El inmunocomplejo de la presente divulgación puede formarse a una variedad de temperaturas, concentración de sal y valores de pH que pueden variar dependiendo del método y la muestra biológica usada, y los expertos en la materia son capaces de ajustar las condiciones adecuadas para la formación de cada inmunocomplejo.

El término "anticuerpo" como se usa en la presente divulgación incluye moléculas intactas así como fragmentos funcionales de las mismas, tales como Fab, F(ab')₂, Fv o moléculas de un solo dominio tales como VH y VL frente a un epítipo de un antígeno. Estos fragmentos de anticuerpos funcionales se definen de la siguiente manera: (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento monovalente de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo, se puede producir mediante la digestión de un anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una parte de una cadena pesada; (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo que puede obtenerse tratando un anticuerpo completo con pepsina, seguido de la reducción, para producir una cadena ligera intacta y una parte de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo; (3) (Fab')₂, el fragmento del anticuerpo que se puede obtener tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin su posterior reducción; F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' mantenidos unidos por dos enlaces disulfuro; (4)

Fv, definido como un fragmento genéticamente modificado que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas como dos cadenas; (5) anticuerpo monocatenario ("SCA"), una molécula modificada genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unidas por un enlazador polipeptídico adecuado como una molécula monocatenaria fusionada genéticamente; y (6) anticuerpos de un solo dominio que están compuestos de un solo dominio VH o VL que presentan afinidad suficiente hacia el antígeno.

Los métodos de producción de anticuerpos policlonales y monoclonales, así como los fragmentos de los mismos, son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988, incorporada en el presente documento por referencia).

Los fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la presente divulgación pueden prepararse mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo o mediante la expresión en *E. coli* o células de mamífero (por ejemplo, cultivo de células de ovario de hámster chino u otros sistemas de expresión de proteínas) del ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpo pueden obtenerse mediante digestión con pepsina o papaína de anticuerpos enteros mediante métodos convencionales. Por ejemplo, se pueden producir fragmentos de anticuerpos mediante la escisión enzimática de los anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento se puede escindir además usando un agente reductor de tiol y, opcionalmente, un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilo resultantes de la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' 3,5S. Como alternativa, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos están descritos, por ejemplo, por Goldenberg, patentes de EE.UU. n.º 4.036.945 y 4.331.647, y las referencias contenidas en las mismas, cuyas patentes se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. Véase también Porter, R. R. [*Biochem. J.* 73: 119-126 (1959)]. También se pueden usar otros métodos de escisión de anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena ligera-pesada monovalentes, la escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

Los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas VH y VL. Esta asociación puede ser no covalente, como se describe en Inbar *et al.* [*Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU.* 69: 2659-62 (19720)]. Como alternativa, las cadenas variables se pueden unir mediante un enlace disulfuro intermolecular o reticularse por productos químicos tales como glutaraldehído. Preferentemente, los fragmentos Fv comprenden las cadenas VH y VL conectadas por un enlazador peptídico. Estas proteínas de unión al antígeno monocatenarias (scFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que se introduce posteriormente en una célula huésped tal como *E. coli*. Las células hospedadoras recombinantes sintetizan una sola cadena polipeptídica con un péptido enlazador que une los dos dominios V. Los métodos de producción de scFv están descritos, por ejemplo, por Whitlow y Filpula, *Methods* 2: 97-105 (1991); Bird *et al.*, *Science* 242:423-426 (1988); Pack *et al.*, *Bio/Technology* 11:1271-77 (1993); y la patente de EE.UU. n.º 4.946.778, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Otra forma de un fragmento de anticuerpo es un péptido que codifica una sola región determinante de la complementariedad (CDR). Se pueden obtener péptidos CDR ("unidades de reconocimiento mínimas") construyendo genes que codifiquen la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes se preparan, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa para sintetizar la región variable a partir del ARN de células productoras de anticuerpos. Véase, por ejemplo, Larrick y Fry [*Methods*, 2: 106-10 (1991)].

También se pueden producir anticuerpos usando diversas técnicas conocidas en la materia, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos [Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]. Se dispone de las técnicas de Cole *et al.* y Boerner *et al.* para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", Alan R. Liss, pág. 77 (1985) y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)]. De forma similar, se pueden fabricar anticuerpos humanos mediante la introducción de locus de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos han sido parcial o completamente inactivados. Tras la exposición, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho a la observada en los seres humanos en todos los aspectos, incluyendo la transposición de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Dicha metodología se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368 812-13 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13, 65-93 (1995).

Los anticuerpos ilustrativos que se pueden usar de acuerdo con la presente divulgación incluyen por ejemplo, el anticuerpo anti-Slc6a4 disponible en Abnova Corporation, Abgent y MBL International; anticuerpo anti-Htr1a disponible, por ejemplo, en Novus Biologicals, Acris Antibodies GmbH y Abnova Corporation; anticuerpo anti-MaoA disponible, por ejemplo, en Abnova Corporation, Proteintech Group, Inc. y Abgent; anticuerpo anti-Adrb1 disponible, por ejemplo, en Biorbyt, Abgent y antibodies-online; anticuerpo anti-Adrb2 disponible, por ejemplo, en Tocris

Bioscience, Abnova Corporation y antibodies-online; anticuerpo anti-receptor de CRH de tipo 1 disponible, por ejemplo, en MyBioSource.com, Abcam y Novus Biologicals; anticuerpo anti-CB1 disponible, por ejemplo, en Santa Cruz Biotechnology, Inc. y Epitomics, Inc.; anticuerpo anti-FKBP5 disponible, por ejemplo, en BD Biosciences y Abnova Corporation; anticuerpo anti-Tph2 disponible, por ejemplo, en Novus Biologicals y Acris Antibodies GmbH; anticuerpo anti-Grm1 disponible, por ejemplo, en Novus Biologicals y Biorbyt; anticuerpo anti-Grik3 disponible, por ejemplo, en Acris Antibodies GmbH y Atlas Antibodies; anticuerpo anti-Grm5 disponible, por ejemplo, en Biorbyt y Acris Antibodies GmbH; anticuerpo anti-Grik2 disponible, por ejemplo, en Proteintech Group, Inc., Aviva Systems Biology y Abgent; anticuerpo anti-Grm7 disponible, por ejemplo, en Acris Antibodies GmbH y antibodies-online; anticuerpo anti-Gria2 disponible, por ejemplo, en Proteintech Group, Inc. y Abnova Corporation; anticuerpo anti-Dscam disponible, por ejemplo, en Novus Biologicals y R&D Systems; anticuerpo anti-L1cam disponible, por ejemplo, en GeneTex, Novus Biologicals y Acris Antibodies GmbH; anticuerpo anti-Tsnax disponible, por ejemplo, en BD Biosciences y GenWay Biotech, Inc.; anticuerpo anti-Sgk1 disponible, por ejemplo, en Epitomics, Inc. y Acris Antibodies GmbH; y/o anticuerpo anti-Stx1a disponible, por ejemplo, en MBL International y Spring Bioscience.

Pueden usarse diversos métodos de detección de la formación del inmunocomplejo de la presente divulgación, y los expertos en la materia son capaces de determinar qué método es adecuado para cada inmunocomplejo y/o el tipo de células usadas para el diagnóstico.

El anticuerpo específico (por ejemplo, anticuerpo anti-Slc6a4, anticuerpo anti-Htr1a, anticuerpo anti-MaoA, anticuerpo anti-Adrb1, anticuerpo anti-Adrb2, anticuerpo anti-receptor de CRH de tipo 1, anticuerpo anti-CB1, anticuerpo anti-FKBP5, anticuerpo anti-Tph2, anticuerpo anti-Grm1, anticuerpo anti-Grik3, anticuerpo anti-Grm5, anticuerpo anti-Grik2, anticuerpo anti-Grm7, anticuerpo anti-Gria2, anticuerpo anti-Dscam, anticuerpo anti-L1cam, anticuerpo anti-Tsnax, anticuerpo anti-Sgk1 y/o anti-Stx1a) usados en el inmunocomplejo de la presente divulgación pueden marcarse usando métodos conocidos en la técnica. Se apreciará que los anticuerpos marcados pueden ser anticuerpos primarios (es decir, que se unan al antígeno específico, por ejemplo, un antígeno específico del gen diana) o secundarios (por ejemplo, anticuerpos de cabra anti-conejo marcados, anticuerpo de ratón anti-ser humano marcado) que se unan a los anticuerpos primarios. El anticuerpo puede conjugarse directamente con un marcador o puede conjugarse con una enzima.

Los anticuerpos de la presente divulgación pueden marcarse fluorescentemente (usando un colorante fluorescente conjugado con un anticuerpo), radiomarcarse (usando anticuerpos radiomarcados, por ejemplo, ¹²⁵I) o conjugarse con una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) y usarse junto con un sustrato cromogénico para producir una reacción colorimétrica. Los sustratos cromogénicos utilizados por los anticuerpos conjugados con enzimas de la presente divulgación incluyen, pero sin limitación, AEC, Fast red, sustrato ELF-97 [2-(5'-cloro-2-fosforiloxifenil)-6-cloro-4(3H)-quinazolinona], fosfato de *p*-nitrofenilo (PNPP), difosfato de fenoltaleína y fosfato de ELF 39, BCIP/INT, Vector Red (VR), fosfato de salmón y magenta (Avivi C, *et al.*, 1994, *J Histochem. Cytochem.* 1994; 42: 551-4) para la enzima fosfatasa alcalina y Nova Red, diaminobenzidina (DAB), sustrato Vector(R) SG, sustrato quimioluminiscente a base de luminol para la enzima peroxidasa. Estos sustratos enzimáticos se pueden adquirir comercialmente en Sigma (St Louis, MO, EE.UU.), Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, EE.UU.), Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, EE.UU.), Zymed Laboratories Inc. (San Francisco, CA, EE.UU.), Dako Cytomation (Dinamarca).

La detección del inmunocomplejo en una muestra biológica, tal como una muestra de sangre o suero, que puede contener polipéptido de gen diana soluble (por ejemplo, secretado, desprendido) puede realizarse usando clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), ensayo inmunoenzimático (ELISA), análisis de transferencia Western y radioinmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación (IP) o mediante una metodología basada en el peso molecular.

Para la transferencia Western, las proteínas se extraen de una muestra de células y se someten a electroforesis (por ejemplo, SDS-PAGE) y transferencia a una membrana (por ejemplo, nylon o PVDF). La membrana se interacciona entonces con un anticuerpo específico (por ejemplo, anticuerpo anti-Slc6a4, anticuerpo anti-Htr1a, anticuerpo anti-MaoA, anticuerpo anti-Adrb1, anticuerpo anti-Adrb2, anticuerpo anti-receptor de CRH de tipo 1, anticuerpo anti-CB1, anticuerpo anti-FKBP5, anticuerpo anti-Tph2, anticuerpo anti-Grm1, anticuerpo anti-Grik3, anticuerpo anti-Grm5, anticuerpo anti-Grik2, anticuerpo anti-Grm7, anticuerpo anti-Gria2, anticuerpo anti-Dscam, anticuerpo anti-L1cam, anticuerpo anti-Tsnax, anticuerpo anti-Sgk1 y/o anticuerpo anti-Stx1a) que puede marcarse directamente o someterse además a un anticuerpo marcado secundario. La detección puede ser por autorradiografía, reacción colorimétrica o quimioluminiscencia. Este método permite tanto la cuantificación de una cantidad de sustrato como la determinación de su identidad mediante una posición relativa sobre la membrana que es indicativa de una distancia de migración en el gel de acrilamida durante la electroforesis.

En el caso de que la concentración del antígeno en la muestra biológica sea baja, la detección del antígeno (secuencia de aminoácidos del gen diana) puede realizarse por inmunoprecipitación (IP). Para el análisis de inmunoprecipitación, el anticuerpo específico (por ejemplo, anticuerpo anti-Slc6a4, anticuerpo anti-Htr1a, anticuerpo anti-MaoA, anticuerpo anti-Adrb1, anticuerpo anti-Adrb2, anticuerpo anti-receptor de CRH de tipo 1, anticuerpo anti-CB1, anticuerpo anti-FKBP5, anticuerpo anti-Tph2, anticuerpo anti-Grm1, anticuerpo anti-Grik3, anticuerpo anti-Grm5, anticuerpo anti-Grik2, anticuerpo anti-Grm7, anticuerpo anti-Gria2, anticuerpo anti-Dscam, anticuerpo anti-

L1cam, anticuerpo anti-Tsnax, anticuerpo anti-Sgk1 y/o anticuerpo anti-Stx1a) puede interaccionar directamente con una muestra (por ejemplo, lisado celular) que incluya el polipéptido del gen diana, y el complejo formado puede detectarse además usando un anticuerpo secundario conjugado a perlas (por ejemplo, si el anticuerpo específico es un anticuerpo monoclonal de ratón, el anticuerpo secundario puede ser un anticuerpo anti-ratón conjugado con, por ejemplo, perlas de sefarosa). Las perlas pueden precipitarse después por centrifugación, después de lo que las proteínas precipitadas (por ejemplo, el polipéptido del gen diana y los anticuerpos específicos) se pueden separar de las perlas (por ejemplo, usando desnaturalización a 95 °C) y someterse además a análisis de transferencia Western usando anticuerpos. Como alternativa, el anticuerpo específico y el anticuerpo secundario conjugado con perlas pueden añadirse a la muestra biológica que contiene el antígeno (polipéptido del gen diana) para formar de este modo un inmunocomplejo. Como alternativa, si el polipéptido del gen diana es una proteína altamente glicosilada, también puede precipitarse usando un sustrato capaz de unirse a polipéptidos glicosilados tales como Concavalina A (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia) que también puede conjugarse con perlas, seguido del análisis de transferencia Western de anticuerpos específicos como se ha descrito anteriormente.

El análisis FACS permite la detección de antígenos presentes en las membranas celulares. En resumen, los anticuerpos específicos, como se ha descrito anteriormente, están unidos a fluoróforos, y la detección se realiza por medio de una máquina de clasificación de células que lee la longitud de onda de la luz emitida desde cada célula a medida que pasa a través de un haz de luz. Este método puede emplear dos o más anticuerpos simultáneamente.

La presencia y/o el nivel del polipéptido del gen diana pueden determinarse también usando ELISA. En resumen, se fija una muestra que contiene el antígeno del gen diana a una superficie tal como un pocillo de una placa de microvaloración. Se aplica un anticuerpo específico del antígeno (por ejemplo, anticuerpo anti-Slc6a4, anticuerpo anti-Htr1a, anticuerpo anti-MaoA, anticuerpo anti-Adrb1, anticuerpo anti-Adrb2, anticuerpo anti-receptor de CRH de tipo 1, anticuerpo anti-CB1, anticuerpo anti-FKBP5, anticuerpo anti-Tph2, anticuerpo anti-Grm1, anticuerpo anti-Grik3, anticuerpo anti-Grm5, anticuerpo anti-Grik2, anticuerpo anti-Grm7, anticuerpo anti-Gria2, anticuerpo anti-Dscam, anticuerpo anti-L1cam, anticuerpo anti-Tsnax, anticuerpo anti-Sgk1 y/o anticuerpo anti-Stx1a) acoplado a una enzima, y se permite la unión al antígeno. La presencia del anticuerpo se detecta entonces y se cuantifica mediante una reacción colorimétrica que emplea la enzima acoplada al anticuerpo. Las enzimas comúnmente empleadas en este método incluyen peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina. Si está bien calibrada y dentro del intervalo lineal de respuesta, la cantidad de sustrato presente en la muestra es proporcional a la cantidad de color producido. En general, se emplea un patrón de sustrato para mejorar la exactitud cuantitativa.

La presencia y/o el nivel de un polipéptido de gen diana también puede determinarse usando radioinmunoensayo (RIA). En una versión, este método implica la precipitación del antígeno deseado (polipéptido del gen diana) con un anticuerpo específico y una proteína de unión al anticuerpo radiomarcada (por ejemplo, proteína A marcada con 125 I) inmovilizada sobre un vehículo precipitable tal como perlas de agarosa. El número de recuentos en el sedimento precipitado es proporcional a la cantidad de antígeno.

En una versión alternativa del RIA, se emplea un antígeno marcado y una proteína de unión al anticuerpo no marcada. Se añade una muestra que contiene una cantidad desconocida de antígeno en cantidades variables. La disminución en los recuentos precipitados del antígeno marcado es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra añadida.

La presencia y/o el nivel de un polipéptido de un gen diana también pueden determinarse usando una metodología basada en el peso molecular. Dado que el inmunocomplejo presenta un peso molecular superior al de sus componentes, también se pueden emplear métodos capaces de detectar dicho cambio en el peso molecular. Por ejemplo, el inmunocomplejo se puede detectar mediante un ensayo de retardo de gel. En resumen, se carga un gel de acrilamida no desnaturalizante con muestras. Un cambio en el tamaño (peso molecular) del producto proteico en comparación con sus componentes es indicativo de la presencia de un inmunocomplejo. Dicho cambio a un peso molecular superior se puede ver usando una tinción de proteína no específica, tal como tinción de plata o tinción de azul de Commassie.

La detección *in situ* del polipéptido del gen diana en una muestra biológica tal como un corte tisular (por ejemplo, inclusión en parafina o criosección) se puede realizar usando métodos de tinción inmunológica que detecten la unión de anticuerpos sobre las células *in situ*. Los ejemplos de procedimientos de tinción inmunológica incluyen, pero sin limitación, inmunohistoquímica marcada fluorescentemente (usando un colorante fluorescente conjugado a un anticuerpo), inmunohistoquímica radiomarcada (usando anticuerpos radiomarcados, por ejemplo, 125 I) e inmunocitoquímica [usando una enzima (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) y un sustrato cromogénico para producir una reacción colorimétrica]. Se apreciará que las enzimas conjugadas a anticuerpos pueden utilizar diversos sustratos cromogénicos como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Preferentemente, la tinción inmunológica usada por la presente divulgación es inmunohistoquímica y/o inmunocitoquímica.

A la tinción inmunológica le sigue preferentemente la tinción de contraste de las células usando un colorante, que se une a compartimentos celulares no teñidos. Por ejemplo, si el anticuerpo marcado se une a los antígenos presentes en el citoplasma celular, una tinción nuclear (por ejemplo, tinción con hematoxilina-eosina) es una tinción de contraste apropiada.

5 De acuerdo con una realización, el método comprende la medición de una expresión del gen Tph2 tras la regulación por disminución del miR-181 y/o miR-27.

10 De acuerdo con una realización, el método comprende la medición de una expresión del gen Slc6a4 tras la regulación por aumento del miR-135 y/o miR-335.

De acuerdo con una realización, el método comprende la medición de una expresión del gen Htr1a tras la regulación por aumento del miR-135, miR-335, miR-181, miR-182 y/o miR-26.

15 De acuerdo con una realización, el método comprende la medición de una expresión del gen MaoA tras la regulación por aumento del miR-27.

20 De acuerdo con una realización, el método comprende la medición de una expresión del gen Adrb1 tras la regulación por aumento del miR-19.

De acuerdo con una realización, el método comprende la medición de una expresión del gen CB1 tras la regulación por aumento del CB 1.

25 De acuerdo con una realización, el método comprende la medición de una expresión del gen del receptor de CRH de tipo 1 tras la regulación por aumento del miR-15.

De acuerdo con una realización, el método comprende la medición de una expresión del gen FKBP5 tras la regulación por aumento del miR-15.

30 Los presentes inventores han comprendido además que mR135 está regulado por aumento en los sujetos que tienen una afección médica asociada con la serotonina (descrita anteriormente).

35 Así pues, se proporciona un método de diagnóstico de una afección médica relacionada con la serotonina en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método la medición de un nivel de expresión de un miR-135 en una sangre del sujeto, en el que un alto nivel de expresión del miR-135 en comparación con el de una muestra de sangre de un sujeto sano es indicativo de la afección médica asociada con la serotonina.

40 Los métodos de análisis de miR en muestras de sangre son bien conocidos en la técnica, y se describen en el presente documento a continuación.

45 El diagnóstico puede evaluarse y establecerse mediante métodos de referencia. Por lo general, al menos uno de entre una historia clínica completa del paciente, evaluación física y evaluación completa de los síntomas ayuda a determinar la causa de la depresión. Los cuestionarios estandarizados pueden ser útiles, tales como la escala de Hamilton para la depresión y el inventario de depresión de Beck.

Los presentes inventores han demostrado además que los niveles en plasma de miR-135a se reducen en los sujetos tratados con un fármaco antidepresivo, tal como Fluoxetina (un antidepresivo de la clase SSRI), mientras que los niveles cerebrales de miR-135a aumentan en estos mismos sujetos (Figuras 3E-J).

50 Por lo tanto, de acuerdo con otra realización de la presente divulgación, se proporciona un método de control del tratamiento de un fármaco antidepresivo, comprendiendo el método: (a) tratar a un sujeto que lo necesita con un fármaco antidepresivo; y (b) medir un nivel de expresión de un miR-135 en la sangre del sujeto antes y después del tratamiento, en el que un nivel de expresión inferior del miR-135 después del tratamiento por el fármaco antidepresivo en comparación con el nivel de expresión del miR-135 antes del tratamiento con el fármaco antidepresivo es indicativo de la eficacia del tratamiento.

55 Como se usa en el presente documento, la expresión "fármaco antidepresivo" se refiere a cualquier medicamento usado para aliviar los trastornos del estado de ánimo, tales como depresión mayor y distimia, y trastornos de ansiedad, tales como trastorno de ansiedad social. Los fármacos antidepresivos ilustrativos incluyen, pero sin limitación, inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (SSRI, tales como Citalopram, Escitalopram, Fluoxetina, Fluvoxamina, Paroxetina y Sertralina); inhibidores de la recaptación de serotonina/norepinefrina (SNRI, como Desvenlafaxina, Duloxetina, Milnacipran y Venlafaxina); antidepresivos serotoninérgicos noradrenérgicos y específicos (tales como Mianserin y Mirtazapina); inhibidores de la recaptación de la norepinefrina (noradrenalina) (NRI, como Atomoxetina, Mazindol, Reboxetina y Viloxazina); inhibidores de la recaptación de norepinefrina-dopamina (tales como Bupropión); potenciadores selectivos de la recaptación de serotonina (tales como Tianeptina); desinhibidores de la norepinefrina-dopamina (NDDI tales como Agomelatina); antidepresivos tricíclicos (incluyendo

antidepresivos tricíclicos de amina terciaria y antidepresivos tricíclicos de amina secundaria); y el inhibidor de la monoaminoxidasa (MAOI).

5 De acuerdo con una realización específica, el fármaco antidepresivo comprende inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI) o inhibidores de la recaptación de noradrenalina (NRI).

La medición del nivel de expresión de miR-135 normalmente se efectúa en una muestra de sangre obtenida del sujeto.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "muestra de sangre" se refiere a sangre entera recién extraída, sangre total fraccionada y plasma sanguíneo. La muestra de sangre se obtiene normalmente del sujeto después del tratamiento con un fármaco antidepresivo; sin embargo, también se puede obtener una muestra de sangre del sujeto antes del tratamiento para una comparación adicional de los niveles de miR-135.

15 Se determina un tratamiento antidepresivo eficaz cuando se obtiene un nivel de expresión inferior del miR-135 después del tratamiento en comparación con el nivel de expresión de miR-135 antes del tratamiento.

20 De acuerdo con otra realización, se proporciona un método de control de una afección psiquiátrica en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método medir un nivel de expresión de un miR-135 en una sangre del sujeto, en el que un nivel alto de expresión del miR-135 en comparación con un sujeto sano es indicativo de la afección psiquiátrica.

25 De acuerdo con otra realización, la afección psiquiátrica comprende una depresión, una ansiedad, un estrés, una fatiga, una función cognitiva deteriorada, un ataque de pánico, un comportamiento compulsivo, una adicción, una fobia social, un trastorno del sueño y un trastorno relacionado con la alimentación.

De acuerdo con una realización específica, miR-135 comprende miR-135a.

30 La medición de un nivel de expresión de un miR-135 puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido por un experto en la materia, como, por ejemplo, mediante el análisis Northern, ensayo de protección contra RNasa y PCR (por ejemplo, PCR en tiempo real).

35 El tratamiento de control también puede efectuarse evaluando el bienestar del paciente y, además o como alternativa, sometiendo al sujeto a pruebas de comportamiento, MRI o cualquier otro método conocido por un experto en la materia.

40 Se espera que durante la vida de una patente, se desarrollen a partir de la presente solicitud muchos inhibidores relevantes de los miARN o, como alternativa, se desarrollen modificaciones de miARN, y el alcance del término "microARN" pretende incluir todas estas nuevas tecnologías a priori.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

45 Los términos y las expresiones "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "que incluye, pero sin limitación".

El expresión "que consiste en" significa "que incluye, y sin limitación".

50 La expresión "que consiste esencialmente en" significa que la composición, el método o la estructura pueden incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes, las etapas y/o las partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y nuevas de la composición, del método o de la estructura que se reivindican.

55 Como se usa en el presente documento, la forma en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes en plural menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

60 A lo largo de la presente solicitud, se pueden presentar diversas realizaciones de la presente invención en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por comodidad y brevedad, y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la invención. Por consiguiente, se debe considerar que la descripción de un intervalo ha revelado específicamente todos los posibles subintervalos, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un intervalo tal como de 1 a 6 tiene subintervalos específicamente desvelados de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6, etc., así como números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

65

Siempre que se indique en el presente documento un intervalo numérico, se pretende incluir cualquier número citado (fracción o número entero) dentro del intervalo indicado. Las expresiones "que varía/varía entre" un primer número de indicación y un segundo número de indicación y "que varía/varía de" un primer número de indicación "a" un segundo número de indicación se usan en el presente documento indistintamente, y pretenden incluir el primer y el segundo números indicados y todos los números, tanto fracciones como enteros, que hay entre los mismos.

Como se usa en el presente documento, el término "método" se refiere a las maneras, los medios, las técnicas y los procedimientos para realizar una tarea dada incluyendo, pero sin limitación, las maneras, los medios, las técnicas y los procedimientos bien conocidos o desarrollados fácilmente de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por los profesionales de las técnicas químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

Se apreciará que ciertas características de la invención, que, por razones de claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. Por el contrario, también se pueden proporcionar diversas características de la invención, que se describen, para abreviar, en el contexto de una sola realización, por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como adecuadas en cualquier otra realización de la invención. Ciertas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no deben considerarse características esenciales de dichas realizaciones, a menos que la realización sea inoperante sin esos elementos.

Diversas realizaciones y aspectos de la presente invención explicadas anteriormente y reivindicadas en el siguiente apartado de reivindicaciones encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Se hace referencia ahora a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una manera no limitante.

En general, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas se explican a fondo en la literatura. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook *et al.*, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren *et al.* (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vol. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como las expuestas en las patentes de EE.UU. n.º 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *et al.* (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la literatura de patente y en la literatura científica, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todo ello incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad. A lo largo del presente documento, se proporcionan otras referencias generales. Se cree que los procedimientos de los mismos son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector. Toda la información contenida en las mismas se incorpora en el presente documento por referencia.

EJEMPLO 1

Expresión diferencial de miR en neuronas de serotonina

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Micromatrices de microARN de neuronas 5HT

Se cultivaron células de rombencéfalo de embriones de 12 días de ratones ePET YFP y se clasificaron para distinguir las neuronas 5HT de las neuronas no 5HT circundantes. Se purificó el ARN total, incluyendo la población de miARN, se marcó y se hibridó en la micromatriz de miARN de ratón de Agilent (Agilent Tech, Mississauga, ON, Canadá) número de diseño 021828 basada en la liberación 12.0 de miRBase de Sanger de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Se rastrearon las micromatrices y se extrajeron los datos fueron y se procesaron usando el software de extracción de funciones (Agilent Technologies). Tras el rastreo, se analizaron los datos de

salida de intensidad de los archivos GeneView.txt para cuantificar la expresión relativa diferencial de los microARN usando el paquete Partek® Genomics Suite (Partek Inc., St. Louis, MO). Los datos fueron transformados al log2, sometidos a normalización de cuantiles y filtrados de acuerdo con el indicador "glsGeneDetected" en el archivo GeneView. De 666 miR murinos, quedaron 198 para el análisis adicional en esta etapa de filtrado. A continuación, se identificaron los miR expresados diferencialmente mediante el uso de un umbral de un cambio de 1,5 veces con significación de acuerdo con ANOVA. Los contrastes se calcularon dentro de la prueba de ANOVA. Se usó la corrección de Benjamini y Hochberg para la reducción de los falsos positivos (corrección de pruebas múltiples).

Clonación de las UTR de 3' en el plásmido de expresión de luciferasa Pscheck2

Se amplificaron las secuencias de UTR de 3' de Slc6a4, Htr1a, MaoA y Tph2 por PCR a partir de ADN genómico de ratón o ADNc cerebral total. Se ligaron los fragmentos de PCR de las UTR de 3' en el vector pGEM-T easy (Promega) de acuerdo con las directrices del fabricante, y se subclonaron además en un único sitio *NotI* en el extremo 3' de la luciferasa del plásmido indicador Pscheck2 (Promega). Las secuencias de UTR de 3' mutadas, que carecían de secuencias semilla de miR-135, se sintetizaron con salientes de cebadores a través de la secuencia de apareamiento de semilla. La orientación de clonación se verificó mediante cortes de diagnóstico y por secuenciación.

Transfección y ensayo de luciferasa

Se cultivaron células HEK293T sobre poli-L-lisina en un formato de 48 pocillos hasta una confluencia del 70-85 % y se transfectaron usando polietilenimina con los siguientes plásmidos: 5 ng de plásmido Pscheck2-UTR de 3' y 215 ng de vector de sobreexpresión para un miARN específico, o plásmidos de sobreexpresión vacío-miR vec. 24 horas después de la transfección, se sometieron las células a lisis y se ensayó la actividad de los indicadores de luciferasa como se ha descrito previamente [Chen A. *et al. Mol Endocrinol* (2005) 19: 441-58]. Se normalizaron los valores de luciferasa de Renilla con respecto a los niveles de luciferasa de luciérnaga de control (transcripción a partir del mismo vector, pero sin afectar por la UTR de 3' ensayada) y se promediaron a lo largo de seis repeticiones de pocillos por condición.

Animales y alojamiento

Se alojaron ratones macho C57BL/6J adultos de 10 semanas de vida (Harlan, Jerusalem, Israel) en una sala con temperatura controlada (22 ± 1 °C) en un ciclo inverso de luz/oscuridad de 12 horas. Se proporcionaron comida y agua a voluntad. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Instituto de Ciencias Weizmann.

Paradigmas del estrés de inmovilización aguda

Se introdujeron ratones adultos en un tubo ventilado de 50 ml durante 30 minutos durante su ciclo oscuro.

Rechazo social crónico

Se sometieron los ratones a un protocolo de rechazo social según lo descrito previamente [Krishnan V. *et al. Cell* (2007) 131: 391-404]. En resumen, se colocaron los ratones en una jaula de un ratón ICR agresivo y se dejaron interactuar físicamente durante cinco minutos. Durante este tiempo, el ratón ICR atacó al ratón intruso, y el intruso mostró una postura subordinada. Después, se colocaron unos divisores perforados de plexiglás transparente entre los animales, y los ratones permanecieron en la misma jaula durante 24 horas para permitir el contacto sensorial. El procedimiento se repitió entonces con un ratón ICR desconocido durante cada uno de los siguientes 10 días.

Tratamiento con antidepresivos

Los ratones recibieron una inyección ip de imipramina tritricíclica o SSRI-Fluoxetina o NRI-Reboxetina (20 mg/kg en solución salina) o solución salina. Las inyecciones crónicas se realizaron durante 18-21 días consecutivos, y se realizó una inyección aguda 24 horas antes de las microdisecciones cerebrales.

Microdissección del núcleo del rafé y recogidas de plasma

Se tomaron muestras cerebrales de núcleo de rafé (RN) de ratón tras extirpar el cerebro y colocarlo en una matriz acrílica de cerebro (Stoelting). Los cortes se recogieron usando cuchillas de afeitar convencionales (GEM) basándose en marcadores anatómicos designados. Se usaron jeringas 14G romas para extraer la región RN de cortes de 3 mm extraídos de la matriz. Además, se recogió sangre del tronco en tubos que contenían EDTA para evitar la coagulación. Tras la centrifugación en 3.500 g durante 30 minutos a 4 °C, se separó el plasma y se mantuvo a -70 °C hasta la purificación del ARN.

Purificación de microARN y análisis de expresión por RT-PCR cuantitativa

Se aislaron ARNm, incluyendo microARN, de neuronas clasificadas, punzones cerebrales congelados y plasma usando el mini kit miRNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se trataron usando miARN del kit miScript de transcripción inversa para generar ADNc. A continuación, se analizaron las muestras de ADNc usando el kit de PCR SYBR®Green (Qiagen) de acuerdo con las directrices del fabricante en el termociclador AB 7500 (Applied Biosystems). Se usaron cebadores específicos para cada miR junto con el cebador universal comercial, mientras que se usó ARNs de U6 como control interno.

Tabla 1B: Secuencias de cebadores usadas para la PCR en tiempo real

SEQ ID NO	Secuencia de cebador	Gen
1	TATGGCTTTTATTCCTATGTGA	miR135a
2	TATGGCTTTTCATTCTATGTGA	miR135b
3	TTTGTTCGTTCCGGCTCGCGTGA	miR375
4	GATGACACGCAAATTCGTGAA	U6
5	TAAGGCACGCGGTGAATGCC	miR124

Tabla 1C: Secuencias de cebadores usadas para la clonación molecular

Secuencia de cebador	Orientación	Tamaño del producto	Gen	
AGTTCTGCCGCTGATGATG (SEQ ID NO: 6)	sentido	2.600 ^{con 2}	UTR de 3' de Htr1a	1
GCACAAATGGAGAGTCTGATT AAA (SEQ ID NO: 7)	antisentido		UTR de 3' de Htr1a	2
TGCCTTTAATGCAAAACAGC (SEQ ID NO: 8)	sentido	2.000 ^{con 4}	UTR de 3' de MaoA	3
CCAAGTTTACAACCATCAAGC A (SEQ ID NO: 9)	antisentido		UTR de 3' de MaoA	4
ATCCGCATGAATGCTGTGTA (SEQ ID NO: 10)	sentido	760 ^{con 6}	UTR de 3' de Slc6a4	5
GTGGGTGGTGAAGAGACAC (SEQ ID NO: 11)	antisentido		UTR de 3' de Slc6a4	6
CCTACACGCAGAGCATTGAA (SEQ ID NO: 12)	sentido	870 ^{con 8}	UTR de 3' de Tph2	7
ACATCCCTGTGGGATTTGAG (SEQ ID NO: 13)	antisentido		UTR de 3' de Tph2	8
TGTCTTGCTTATTTTTCTCAGT AG (SEQ ID NO: 14)	sentido	320 ^{con 6}	UTR de 3' de Slc6a4 mutada	9
GAAAATATAAGCAAGACATCC CTGTT (SEQ ID NO: 15)	antisentido	440 ^{con 5}	UTR de 3' de Slc6a4 mutada	10
AAAGATCCCTTTCCCAATG (SEQ ID NO: 16)	sentido	1.400 ^{con 12}	UTR de 3' de Htr1a corta	11
CAGTGCGTCTTCTCCACAGA (SEQ ID NO: 17)	antisentido		UTR de 3' de Htr1a corta	12
ATAAGCAAGGGCCCAAAAGGA AGA (SEQ ID NO: 18)	sentido	1.300 ^{con 12}	UTR de 3' de Htr1a mutada Semilla 1	13
TTTTGGGCCCCTTGCTTATAAGT CC (SEQ ID NO: 19)	antisentido	120 ^{con 11}	UTR de 3' de Htr1a mutada Semilla 1	14
CTGCCCTGCCACATGTGTTTT AT (SEQ ID NO: 20)	sentido	170 ^{con 12}	UTR de 3' de Htr1a mutada Semilla 2	15
TAACAAATAAAAACACATGTG GCA (SEQ ID NO: 21)	antisentido	1.260 ^{con 11}	UTR de 3' de Htr1a mutada Semilla 2	16
ACCGGTCATATGATTCCTCCAGT TTCCTGCTTT (SEQ ID NO: 22)	sentido	199 ^{con 18}	Pre-mmu-miR135b	17
ACCGGTCCTCTGTGGCTGGTCC TTAG (SEQ ID NO: 23)	antisentido		Pre-mmu-miR135b	18

Clonación de vector vírico de sobreexpresión de miR135b

Se amplificó por PCR pre-miR-135b a partir de ADN genómico de ratón con cebadores añadiendo sitios *AgeI* de enzima de restricción y luego se incubó en el vector pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI). Después de la

secuenciación de pGEM-T Easy y la digestión de ambos vectores pGEM-T Easy y pEGFP (Clontech Laboratories Inc., Mountain View, CA) con el AgeI, se ligó la secuencia prematura de miR-135b al vector pEGFP para construir el plásmido de expresión PEGFP-miR-135b. Posteriormente, se cortó pEGFP-miR-135b mediante *Bam*HI y *Bsr*GI en paralelo con el plásmido pCSC-E/Syn-eGFP de corte con las mismas enzimas, y se ligó la secuencia de miR-135b-eGFP a pCSC-E/Syn para construir el plásmido pCSC-eSNY-pre-miR-135beGFP, que se confirmó mediante análisis de endonucleasa de restricción y secuenciación de ADN.

Producción de vectores lentivíricos

Se produjeron lentivirus recombinantes por transfección transitoria en células HEK293T, como se ha descrito previamente [Naldini L *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* (1996) 93:11382-8]. En resumen, se cosecharon los lentivirus infecciosos a las 48 y 72 horas después de la transfección, se filtraron a través de filtros de acetato de celulosa de 0,45 µm de poro y se concentraron por ultracentrifugación.

Inyecciones intracerebrales de lentivirus

Para proporcionar un control de precisión sobre la cirugía estereotáxica y el lugar de la administración lentivírica, los inventores usaron un instrumento estereotáxico guiado por ordenador y un nanoinyector motorizado (Angle Two™ Stereotaxic Instrument, myNeurolab). Como se ha descrito anteriormente [Singer O. *et al. Nat Neurosci* (2005).8, 1343-9], se colocaron los ratones en un aparato estereotáxico bajo anestesia general, y se determinaron las coordenadas como se define en el atlas de Franklin y Paxinos. Se administró el preparado lentivírico usando una jeringa Hamilton conectada al sistema nanoinyector motorizado y se inyectó la solución a una velocidad de 0,2 µl cada 1 min. Después de dos semanas de período de recuperación, se sometieron los ratones a estudios de comportamiento y fisiológicos, y después se anestesiaron y perfundieron con paraformaldehído al 4 % tamponado con fosfato. Se cortaron en serie los cerebros fijados cortes de 30 µm con el fin de confirmar la precisión del sitio de inyección, mediante inmunohistoquímica.

Inmunohistoquímica

El procedimiento usado para la inmunohistoquímica se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente [Chen A *et al. J Neurosci* (2006) 26: 5500-10]. Para la inmunotinción con GFP, los inventores usaron anticuerpos anti-GFP biotinilados generados en conejo como anticuerpo primario (Abeam, Cambridge, Reino Unido) y Cy2 conjugado con estreptavidina como anticuerpo secundario (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA, EE.UU.).

Evaluaciones del comportamiento

Todas las evaluaciones del comportamiento se realizaron durante la fase oscura después de la habituación a la sala de ensayo durante 2 horas antes de cada ensayo.

Ensayo de suspensión por la cola

El ensayo de suspensión por la cola se realizó en el monitor de suspensión por la cola TSE (TSE Systems, Bad Homburg, Alemania). Se cogió cada ratón por la punta de la cola, y suspendido del sensor de fuerza durante 10 minutos. Se calcularon el tiempo que permanecieron inmóviles y el tiempo que pasaron forcejeando, y se registraron mediante el software basado en umbrales preestablecidos.

Ensayo de natación forzada modificado

El ensayo de suspensión por la cola se realizó como se ha descrito previamente [Krishnan V y Nestler E. J., *Nature* (2008) 455: 894-902]. En resumen, el aparato usado fue una cubeta de plástico de 18 cm de diámetro, llenado con agua a 25 °C hasta una profundidad de 15 cm. Se colocó cada ratón en el centro de la cubeta para iniciar una sesión de prueba grabada por video de 6 minutos. Se registró automáticamente la duración del tiempo inmóvil durante los 2-6 minutos del ensayo usando EtoVision XT (Noldus, Wageningen, Países Bajos).

Actividad locomotora

Para controlar la posibilidad de los efectos del comportamiento derivados de las diferencias en el movimiento ambulatorio, se examinó la actividad locomotora de ratones durante un período de 48 horas, que se prolongó durante unos días de habituación. Los ratones fueron alojados individualmente en jaulas domésticas especializadas y se midió la locomoción usando el sistema InfraMot (TSE Systems, Bad Hamburg, Alemania).

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media ± ETM. Para ensayar la significación estadística, se usó la prueba t de Student en los casos en los que solo se compararon dos grupos, tales como entre la PCR cuantitativa de validación de micromatrices. Se usaron ANOVA de una vía para comparar entre múltiples grupos tales como entre los diferentes tratamientos en el ensayo de luciferasa. Se usaron ANOVA de dos vías en los casos de 2 variables independientes, tales como la inyección de SSRI NRI, tanto en la duración aguda como crónica. Se usaron pruebas t

post hoc cuando era necesario revelar la significación estadística. Las diferencias entre los grupos se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Se aislaron neuronas 5HT del RN de embriones ePET YFP, y se comparó su perfil de expresión de miR con las neuronas no 5HT, obtenidas del mismo núcleo, usando micromatriz de miR (Figura 1A). Se encontró que catorce miR fueron regulados por aumento y veinticinco regulados por disminución en más del doble de las neuronas 5HT en comparación con las neuronas no 5HT (véanse las Tablas 2A-B, más adelante). Se realizó la validación representativa de los resultados de la matriz mediante PCR en tiempo real para las miR reguladas por aumento en las neuronas 5HT tales como miR-375 ($p = 0,0071$, Figura 1B) y reguladas por disminución tales como miR-135a ($p = 0,0075$, Figura 1C). Con el fin de seguir estudiando el papel de los miR como moduladores de las neuronas 5HT, se realizó un amplio análisis bioinformático de una manera impulsada por una hipótesis. La predicción de la dirección de los genes relacionados con la serotonina conocidos sobre los que se ha demostrado previamente que se asocian con psicopatologías, se cruzaron con los resultados de las micromatrices. Se escogieron los cuatro siguientes genes diana codificantes de proteínas expresados en neuronas 5HT en el RN para el ensayo: el transportador de serotonina, responsable de la recaptación de 5HT (también conocido como SERT o Slc6a4); el receptor inhibitor de la serotonina 1a (también conocido como Htr1a); la triptófano hidroxilasa 2 (Tph2), la enzima limitante de la velocidad de la síntesis de 5HT en el cerebro; y la monoamina hidroxilasa (MaoA), que desactiva 5HT. Las predicciones de dirección de los microARN para estos genes se realizaron usando dos algoritmos basados en web diferentes: Target Scan [www.targetscan.org] y Miranda [www.microrna.org], y se cruzaron con la lista de 91 MiR modificados en al menos $\pm 1,5$ en la matriz de miR de neuronas 5HT, en comparación con las células no 5HT. Basándose en los datos de la matriz de miR y el análisis bioinformático, se escogieron ocho miR para otros estudios *in vitro* (Figura 1D-G).

Tabla 2A: Lista de miR regulados por aumento en neuronas 5HT en comparación con no serotoninérgicas (en más del doble).

Cambio	Nombre del microARN
20,72	mmu-miR-375
11,73	mmu-miR-376c
4,44	mmu-miR-7a
2,87	mmu-miR-137
2,79	mghv-miR-M1-2
2,61	mmu-miR-709
2,51	mmu-miR-291b-5p
2,40	mmu-miR-1224
2,37	mmu-miR-1892
2,31	mmu-miR-702
2,25	mmu-miR-139-3p
2,24	mmu-miR-762
2,10	mmu-miR-671-5p
2,04	mmu-miR-483*

Tabla 2B: Lista de miR regulados por disminución en neuronas 5HT en comparación con no serotoninérgicas (en más del doble)

Cambio	Nombre del microARN
-5,10	mmu-miR-691
-4,11	mmu-miR-4661
-3,95	mmu-miR-17
-3,18	mmu-miR-376b
-3,13	mmu-miR-124
-3,08	mmu-miR-218
-2,99	mmu-miR-128
-2,92	mmu-miR-140*
-2,86	mmu-miR-148a
-2,86	mmu-miR-340-5p
-2,82	mmu-miR-181c
-2,72	mmu-miR-210
-2,69	mmu-miR-135a
-2,66	mmu-miR-27a
-2,45	mmu-miR-452
-2,20	mmu-miR-370
-2,19	mmu-miR-300
-2,17	mmu-miR-376a

-2,13	mmu-miR-127
-2,12	mmu-miR-15b
-2,07	mmu-miR-101a
-2,06	mmu-miR-16
-2,05	mmu-miR-324-5p
-2,05	mmu-miR-434-5p
-2,03	mmu-miR-92a
-2,00	mmu-miR-669i

Se realizaron ensayos de luciferasa *in vitro* para ensayar las interacciones de miR-diana entre la UTR de 3' del gen relacionado con 5HT ensayado y los miR predichos supuestamente dirigidos al mismo. Los inventores encontraron que la UTR de 3' de Tph2 fue ligeramente reprimida (aproximadamente un 20 %) por miR-27b ($p = 0,0051$) y miR-181C ($p = 0,0305$, Figura 1H) y la UTR de 3' de MaoA también fue reprimida por miR-27b ($p = 0,0008$, Figura 1I). La dirección para miR-135 de la UTR de 3' de Slc6a4 (Figura 2A y 2C) y la UTR de 3' de Htr1a (Figura 2B y 2D) dio lugar a la represión robusta de la traducción de estas transcripciones. Mientras que miR-135a condujo a aproximadamente el 30 % de represión hacia Slc6a4 ($p = 0,014$) y Htr1a ($p < 0,0001$), miR-135b causó aproximadamente el 50 % de represión hacia Slc6a4 ($p = 0,0002$) y Htr1a ($p < 0,0001$). Además, se generó una represión significativa de la UTR de 3' de Htr1a por miR-335 ($p < 0,0001$), miR-181c ($p = 0,0029$) y miR-26a ($p < 0,0001$, Figura 2D). Otros análisis bioinformáticos de enfoque genómico revelaron una fuerte conservación del apareamiento semilla de miR-135 en la UTR de 3' de slc6a4 (Figura 2E) y en uno de los dos apareamientos semilla identificados en la UTR de 3' de Htr1a (Figura 2F). Los estudios de mutación en la UTR de 3' de la transcripción de Slc6a4, que eliminó el apareamiento semilla de miR de miR-135, revelaron que la dirección tanto para miR-135a como miR-135b de Slc6a4 fue mediada a través de su secuencia de apareamiento semilla. La represión inducida por el miR-135 fue totalmente bloqueada por la mutación en la UTR de 3' de Slc6a4 (Figura 2G). La mutación de los apareamientos semilla de miR-135 de Htr1a individualmente o ambos revelaron que miR-135a estaba reprimiendo la UTR de 3' de Htr1a a través del apareamiento semilla distal y no proximal, mientras miR-135b actúa a través de ambos sitios predichos (Figura 2H).

Los inventores ensayaron además la regulación de la expresión de miR-135 en el RN *in vivo* después de diferentes exposiciones ambientales o tratamientos farmacológicos. Tras la manipulación de los ratones (es decir, el estrés agudo por inmovilización) se extirpó el RN, se extrajo el ARN y se ensayaron los niveles de miR-135 usando PCR en tiempo real. Dado que se sabe que los niveles de 5HT son alertados por el estrés agudo, los inventores ensayaron los niveles de miR-135 en diferentes puntos temporales después de un estrés de restricción agudo, y encontraron que tanto miR-135a como miR-135b fueron regulados por disminución 90 minutos después del estrés agudo ($p < 0,0001$). Los niveles reducidos de estos miR permanecieron 24 horas después del estrés, en comparación con los ratones de control ($p = 0,0357$ para miR-135a, Figura 3A, $p = 0,0055$ para miR-135b, Figura 3B). Además, como se sabe que las funciones neuronales de 5HT y los niveles de expresión de Slc6a4 y Htr1a están fuertemente afectados en pacientes deprimidos y después de una medicación con antidepresivos, los inventores ensayaron los niveles de las dos variantes de miR en ratones expuestos a un modelo ambiental para la inducción de comportamientos de tipo depresión (modelo de rechazo social crónico) y al antidepresivo tricíclico, Imipramina. Curiosamente, el estrés por rechazo social crónico no alteró los niveles de miR-135 en el núcleo del rafe; sin embargo, la imipramina administrada de forma aguda o crónica, tanto en ratones estresados como no estresados, aumentó los niveles de expresión de miR-135a ($p = 0,003$, Figura 3C) y de miR-135b ($p = 0,0093$, Figura 3D) en el RN. Dado que la imipramina no es un inhibidor específico de la recaptación de 5HT, los inventores ensayaron además el efecto de los inhibidores selectivos de la recaptación de la serotonina (SSRI), Fluoxetina, y los inhibidores de la recaptación de noradrenalina (NRI), Reboxetina, y encontraron un fuerte aumento en los niveles de miR-135a tras un tratamiento con SSRI agudo o crónico ($p < 0,0001$, Figura 3E), y no en los niveles de miR-135b en el RN (Figura 3F). Intrigados por el cambio en los niveles de miR-135 en el RN después del tratamiento con SSRI, los inventores ensayaron los niveles de miR-135 circulante en el plasma de ratones, y encontraron una gran disminución de los niveles de miR-135a tanto después de la administración aguda como crónica (Figura 3H) (efecto principal para el fármaco, $p < 0,0001$, Figura 3G) y ningún efecto en los niveles de miR-135b en circulación (Figura 3H), lo que sugiere una fuerte correlación inversa entre los niveles de miR-135a en el RN y en el plasma después de la administración de SSRI (Figura 3I y 3J).

Para explorar más a fondo la importancia de los niveles de miR-135 en el contexto de un animal entero, los inventores manipularon los niveles de miR-135 *in vivo* específicamente en el RN de ratones adultos y ensayaron sus efectos en los comportamientos de tipo depresivo en ratones. Con este fin, los inventores construyeron lentivirus recombinantes que sobreexpresaban miR-135b específicamente en neuronas usando el promotor de sinapsina potenciado, que también coexpresó el indicador GFP (véase el apartado de procedimientos experimentales y materiales anterior y la Figura 4A). Los inventores ensayaron los lentivirus *in vivo* inyectándolos en el RN de ratones adultos y compararon los niveles de miR-135b en el RN con los ratones que recibieron inyección de lentivirus de control. El análisis de PCR en tiempo real de los niveles de miR-135b reveló una inducción de 10 veces en comparación con los ratones que recibieron por inyección lentivirus de control ($p = 0,0032$, Figura 4B). Se expusieron los ratones adultos inyectados con sobreexpresión de miR-135b a rechazo social crónico, para iniciar el comportamiento de tipo depresivo, y posteriormente fueron sometidos a ensayos de comportamiento. Tras el ensayo

de comportamiento, los ratones fueron perfundidos, y se analizaron los cerebros para localizar el sitio de inyección (Figuras 4C-D). Los ratones que sobreexpresaban miR-135 en el RN mostraron un tiempo de inmovilidad reducido en el ensayo de natación forzada ($p = 0,0088$ en el minuto 3 y $p = 0,00330$ en el minuto 4, Figura 4E) y en el ensayo de suspensión por la cola ($p = 0,07356$ en los últimos 5 min del ensayo, Figura 4F), sin que se observara ningún cambio en la locomoción de su jaula (Figuras 4G-H), lo que sugiere un efecto antidepresivo para la sobreexpresión de miR-135.

Tomados en conjunto, los presentes inventores determinaron la identificación genética de la expresión de miR específicos de las neuronas serotoninérgicas y no serotoninérgicas del RN. Los presentes inventores cruzaron este conjunto de datos únicos con la predicción bioinformática para la dirección para los miR de genes relacionados con 5HT. Los presentes inventores ensayaron *in vitro* la predicción de dirección para Tph2, MaoA, Slc6a4 y Htr1a usando ensayos de luciferasa de UTR de 3' y en estudios de mutación, y revelaron, entre otras interacciones de miR-diana, un potente efecto inhibidor para miR-135 en UTR de 3' tanto de S16a4 como de Htr1a. Además, los inventores demostraron que el miR-135 en el RN está regulado por disminución por el estrés agudo, y regulado por aumento por la administración de antidepresivos, específicamente por los fármacos SSRI. Además, los presentes inventores identificaron una correlación inversa entre los niveles de miR-135a en el RN con respecto a sus niveles en el plasma después de la administración de SSRI. Por último, los presentes inventores demostraron que la sobreexpresión específica de sitio de miR-135 en el RN de ratones adultos conduce a una disminución de los comportamientos de tipo depresivos tras el rechazo social.

EJEMPLO 2

miR-19 se dirige específicamente al receptor beta adrenérgico de tipo uno (Adrb1)

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Clonación de las UTR de 3' en el plásmido de expresión de luciferasa Psichck2

Se amplificó la secuencia UTR de 3' de ADRb1 por PCR a partir del ADN genómico de ratón. Las secuencias UTR de 3' mutadas, que carecen de los cuatro apareamientos semilla de miR-19, fueron sintetizadas por Epoch Biolabs, Inc. (TX, EE.UU.). Se ligaron los fragmentos de PCR de UTR de 3' en el vector pGEM-T easy (Promega) de acuerdo con las directrices del fabricante y se subclonaron además en un solo sitio NotI en el extremo 3' de luciferasa en el plásmido indicador Psichck2 (Promega). La orientación de clonación se verificó mediante cortes de diagnóstico y por secuenciación.

Transfecciones y ensayo de luciferasa

Se cultivaron células HEK293T o células neuronales HT22 sobre poli-L-lisina en un formato de 48 pocillos hasta una confluencia del 70-85 % y se transfectaron usando polietilenimina con los siguientes plásmidos: plásmido Psichck2-UTR de 3', sobreexpresión de pre-mmu-miR-19b en el plásmido pEGFP o el plásmido pEGFP solo (clontech), el plásmido de desactivación (KD) de miR-19b (Genecopoeia) o el plásmido KD de control (Genecopoeia). 24 horas después de la transfección, se sometieron las células a lisis y se ensayó la actividad de los indicadores de luciferasa como se ha descrito previamente [Chen A. *et al. Mol Endocrinol* (2005) 19: 441-58]. Se normalizaron los valores de luciferasa de Renilla con respecto a los niveles de luciferasa de luciérnaga de control (transcripción a partir del mismo vector, pero sin afectar por la UTR de 3' ensayada) y se promediaron a lo largo de seis repeticiones de pocillos por condición.

RESULTADOS

El análisis bioinformático para genes relacionados con el estrés con secuencias diana de miARN conservadas evolutivamente, distintas, que contienen varias repeticiones en su UTR de 3' reveló miR-19 como un potente candidato para la dirección del receptor beta adrenérgico de tipo 1 (Adrb1), con tres apareamientos semilla de miR-19 fuertemente conservados y uno menos conservado en la UTR de 3' de Adrb1. Adrb1 es un receptor adrenérgico que se expresa en diversas regiones del cerebro incluyendo la amígdala, el hipocampo y el núcleo paraventricular (PVN). Adrb1 de la amígdala se había descrito anteriormente como aquel que afecta al comportamiento de tipo ansiedad [Fu A *et al., Brain Res* (2008) 1211: 85-92; Rudoy C. A. y Van Bockstaele E. J., *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* (2007) 31: 1119-29] y los recuerdos de miedo [Roosendaal B. *et al., J Neurosci* (2004) 24: 8161-9; Roosendaal B. *et al., Neuroscience* (2006) 138: 901-10]. Curiosamente, Adrb1 se encontró en las células CRF positivas de la amígdala, y es un receptor acoplado a la proteína G (GPCR) que ejerce su efecto a través de Gs activando además la adenilato ciclasa (AC). Hay 10 genes conocidos que codifican la AC, es decir, ADCY1-10. Tres de ellos (ADCY1, ADCY7 y ADCY9) fueron predichos mediante bioinformática como dirigidos por miR-19. ADCY1 tiene una expresión específica en el cerebro, y se ha demostrado previamente que la sobreexpresión de la misma en el prosencéfalo del ratón mejora la memoria de reconocimiento y LTP [Wang H *et al., Nat Neurosci* (2004) 7: 635-42].

Con el fin de investigar si miR-19 regula realmente la expresión de Adb1 o ADCY1 a través de sus supuestas secuencias diana en la UTR de 3' de Adb1 o la UTR de 3' de ADCY1, se clonaron una forma intacta o formas mutadas de la UTR de 3' de Adb1 (Figura 5) o la UTR de 3' de ADCY1 cadena abajo del gen de la luciferasa en el plásmido de expresión Psicheck2. En la forma mutada de UTR de 3' de ADRb1 los 4 apareamientos semilla para miR-19b estaban ausentes (Figura 5). En la forma mutada de la UTR de 3' de ADCY1 parcial, solo estaba ausente el apareamiento semilla conservado (de los 3).

El ensayo de luciferasa se usó para determinar la naturaleza de la interacción entre miR-19 y la UTR de 3' de Adb1 y también entre miR-19 y la UTR de 3' de ADCY1. En células HT22, que expresan endógenamente niveles bajos de miR-19, no se encontró diferencia entre los niveles de luciferasa controlados por la forma intacta o mutada la UTR de 3' de Adb1 (Figura 6A). Sin embargo, cuando se sobreexpresó miR-19b en células HT22, los niveles de luciferasa fueron significativamente (aproximadamente 2 veces) inferiores cuando fueron conducidos por la forma intacta con respecto a la forma mutada de la UTR de 3' de Adb1 (además de una reducción general, aparentemente no específica, de la expresión de luciferasa normalizada) (Figura 6B). En células HEK293T que expresan endógenamente niveles altos de miR-19b, los niveles de expresión de luciferasa regulados por la UTR de 3' de Adb1 fueron de 2 a 4 veces más bajos que los expresados cuando se regularon por la forma mutada de la UTR de 3' de Adb1 (Figuras 6C).

Se usó el sistema de desactivación (KD) de miR con el fin de manipular los niveles de miR-19 en células HEK293T. En concreto, (1) las sondas miRCURY LNA KD (Exiqon, MA, EE. UU. Figura 6D), y (2) la secuencia de desactivación basada en plásmidos miArrest (Genecopoeia, Rockville, MD, EE.UU., Figura 6E). LNA-Anti-miR-19b aumentó los niveles de luciferasa expresados cuando se reguló bajo la UTR de 3' de Adb1 en aproximadamente un 20 % con respecto a la sonda KD codificada de control y no tuvo ningún efecto sobre la forma mutada de la UTR de 3' de Adb1 (Figura 6D). Mientras que miR-19b KD basado en plásmido, produjo un aumento de hasta el doble de la expresión de la luciferasa regulada por la forma intacta de la UTR de 3' de Adb1 en relación con la secuencia KD de control (Figura 6E). No se logró el rescate completo de los niveles de luciferasa en relación con el impulsado por la forma mutante de la UTR de 3' de Adb1. Esto puede explicarse bien por la especificidad hacia miR-19b de la sonda/secuencia genómica (regulación de miR-19a de Spearing), los altos niveles de miR-19 en células HEK293T que pueden ser difíciles de regularse completamente por disminución o el efecto de otros posibles miARN expresados en células HEK293T que pueden unirse a las mismas secuencias de apareamiento semilla en la UTR de 3' de Adb1.

EJEMPLO 3A

miR-19a y miR-19b se regulan por aumento en el PFC y en la amígdala tras el estrés crónico

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Animales y alojamiento

Se cruzan ratones miR 17~92 *flx/flx* [Ventura A *et al*, *Cell* (2008) 875-86:(5)132; 7] con ratones CamKIIa-Cre [Dragatsis I *et al* *Genesis*. (2000) 26(2): 133-5]. Los ratones transgénicos o ratones macho C57BL/6J adultos se alojan en una sala con temperatura controlada (22 ± 1 °C) en un ciclo inverso de luz/oscuridad de 12 horas. Se proporciona comida y agua a voluntad. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Instituto Weizmann de Ciencias.

Generación de lentivirus para la manipulación miR-19b en cerebro adulto

Se clonó la secuencia KD de miR-19b en un plásmido lentivírico siguiendo tras el promotor de ARN polimerasa III-H1. Además, se clonó la secuencia de Pre-miR-19b tras un promotor específico neuronal (sinapsina potenciada, ESyn) en un plásmido lentivírico. Se generan lentivirus para los experimentos de sobreexpresión (OE) *in vivo* de miR-19b-KD y Pre-miR-19b. Estos lentivirus se usan para manipular los niveles de miR-19b en regiones diana donde los niveles de miR-19 resultan alterarse después de una exposición de comportamiento/farmacológica.

Generación de ratones carentes de miR-19 en el prosencéfalo

Con el fin de generar ratones carentes de miR-19 en el prosencéfalo, los inventores están reproduciendo ratones portadores del gen que codifica la Cre recombinasa bajo el promotor CamKIIa, con ratones portadores de una forma condicional del grupo de miR miR17~92. La familia miR-19 incluye miR-19a y miR-19b. En el genoma del ratón, miR-19b tiene dos copias idénticas, miR-19b-1 y miR-19b-2. miR19a y miR-19b-1 se encuentran en el mismo grupo de miARN, es decir, miR17~92, mientras que miR-19b-2 se encuentra en un locus genómico diferente, miR106a~363. Este último parece tener poca o ninguna expresión en tejidos de ratón y, por lo tanto, la desactivación del grupo miR17~92 se espera que sea suficiente para permitir un efecto profundo en los niveles de expresión de miR-19a y miR-19b en el prosencéfalo.

Exposición de comportamiento/farmacológica

Se examinaron los ratones carentes del grupo miR-17~92 en el prosencéfalo o ratones en los que miR-19 fue manipulado específicamente (sobreexpresado o regulado por disminución (KD) en regiones específicas del cerebro) para determinar los niveles de expresión de ADRb1, ADCY1, y otras transcripciones y productos génicos. Estos animales también se ensayaron para determinar el comportamiento de tipo ansiedad, la actividad locomotora y el rendimiento de la memoria. Además, se examinan los niveles de expresión de miR-19a y miR-19b en diferentes regiones de interés (por ejemplo, en el hipocampo, la amígdala y el prosencéfalo) tras un tratamiento sistémico agudo y crónico con el inhibidor de la recaptación de la noradrenalina Reboxetina en ratones WT.

RESULTADOS

Se estudió el enlace fisiológico entre miRNA-19 y ADRb1 mediante la evaluación del nivel de miR-19a/b en la corteza prefrontal (PFC) de ratones que recibieron por inyección Reboxetina, un inhibidor de la recaptación de la noradrenalina (NRI), aguda o crónicamente (Figuras 12A-D). Como se muestra en las Figuras 12A-D, los niveles de miR-19 a/b se regularon por disminución tras la administración aguda de la Reboxetina (Figura 12A,B) y se regularon por aumento tras la administración crónica de Reboxetina (Figura 12C, D).

A continuación, se evaluaron los niveles de miR-19 después del estrés mediante la medición de los niveles de miR-19 a y b en el PFC y la amígdala de ratones sometidos al protocolo de rechazo social (Figuras 13A-D). Como se muestra en las Figuras 13A-D, los niveles de miR-19 a y b aumentaron tanto en el PFC como en la amígdala tras el estrés crónico. Estos resultados ilustran la participación de miR-19 en la regulación de la respuesta de estrés central.

EJEMPLO 3B

miARN-19 y receptor canabinoide 1 (CB1)

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Animales y alojamiento

Como se describe en el Ejemplo 3A anterior.

Generación de lentivirus para la manipulación miARN-19b en cerebro adulto

Como se describe en el Ejemplo 3A anterior.

RESULTADOS

El CB1 es uno de los GPCR más abundantemente expresados en el cerebro y está particularmente enriquecido en la corteza, amígdala, hipocampo, ganglios basales y cerebelo (Figuras 15A-B) [Herkenham M. *et al.*, *The Journal de neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* (1991) 11:563-583; Mackie, K. "Handbook of experimental pharmacology" (2005) 299-325]. Los receptores CB1 están altamente expresados en axones y terminales axónicos, en los que están bien posicionados para modular la neurotransmisión. Los inventores encontraron que CB1 contiene 2 sitios semilla que son compatibles con miARN-19.

Se usó un ensayo de luciferasa para determinar la naturaleza de la interacción entre miARN-19 y UTR de 3' de CB1. Cuando se sobreexpresó miARN-19b en las células HT22 junto con la UTR de 3' de CB1, los niveles de luciferasa fueron significativamente (50 %) más bajos en comparación con GFP sobreexpresado con la mismo UTR de 3' (Figura 14), apoyando un posible papel de miR-19 en la regulación de los niveles de CB1. Se realizan experimentos de mutación adicionales para verificar el papel de la secuencia semilla de miR-19 predicha en la regulación observada (como se describe para ADRb1 anterior).

Curiosamente, estudios previos han demostrado de manera convincente que la consolidación de recuerdos aversivos se ve facilitada por la conversación cruzada entre los glucocorticoides, la señalización noradrenérgica y canabinoide en el núcleo basolateral de la amígdala (BLA) [Roozendaal, B. *et al.* "Neurobiology of learning and memory" (2006) 86:249-255]. Un modelo propuesto por Hill y McEwen [Hill M. N. y McEwen B. S. *Proc de the Nat Acad de Sci de EE.UU.* (2009) 106:4579-4580] muestra un posible mecanismo de acción en el BLA para la consolidación de la memoria (Figura 16).

Como se muestra en los presentes resultados, miARN-19 parece regular tanto ADRb1 como CB1 *in vitro*. Se llevan a cabo la sobreexpresión y la desactivación de miR-19 usando, por ejemplo, lentivirus administrados específicamente en el BLA, donde puede alterar los niveles de ADRb1 y CB1, así como ensayos para examinar el rendimiento de los ratones en el aprendizaje y los paradigmas de la memoria como el condicionamiento al miedo con y sin exposición a desafíos estresantes.

EJEMPLO 3C

Identificación de miARN expresados diferencialmente en ratones sometidos a estrés crónico

5 MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Inmunoprecipitación de la proteína Ago2

Se homogenizaron combinaciones de 3 amígdalas de 3 animales que formaban parte del mismo grupo ("Susceptible", "Resiliente" o Control) en tampón NP40 que se suplementó con inhibidor de RNasa, inhibidor de proteasa e inhibidor de fosfato. Se mantuvieron las muestras en agitación constante durante 2 horas a 4 °C. A continuación, se centrifugaron las muestras durante 20 minutos a 12.000 rpm a 4 °C en una microcentrifugadora, se colocó el sobrenadante en un tubo nuevo mantenido en hielo y se desechó el sedimento. Se incubaron perlas magnéticas de proteína G (Dynabeads, Invitrogen) con el anticuerpo monoclonal Ago2 (WAKO) con rotación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Tras varios lavados, se añadieron las muestras a las perlas de proteína G recubiertas con Ago2 y se incubaron durante la noche a 4 °C bajo agitación. Al día siguiente, se lavaron las perlas 3 veces con PBS. Para la purificación del ARN, se homogeneizaron las perlas en tampón RLT (kit RNeasy, protocolo suplementario de miARN). Para el análisis de transferencia Western, se hirvieron las perlas en tampón de muestra para liberar la proteína de las perlas.

Purificación del ARN y micromatrices

Se aisló el ARN de las muestras de inmunoprecipitación de Ago2 usando el kit RNeasy plus (Qiagen) después del Protocolo suplementario 1 de Qiagen: Purificación de ARN total que contenía miARN. El ARN para todos los demás fines se aisló de golpes de cerebro congelados usando el minikit miRNeasy (Qiagen) de acuerdo con la recomendación del fabricante, y la integridad del ARN se evaluó usando el bioanalizador Agilent 2100. El ARN derivado de tejidos de ratones sometidos a estrés después de la inmunoprecipitación de Ago2 se analizó además en matrices Affymetrix miRNA 2.0 (protocolo de ARN enriquecido) y matriz Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST.

30 RESULTADOS

Para identificar y estudiar los miARN expresados diferencialmente aislados de la amígdala de ratones sometidos a un paradigma de estrés crónico y/o asociados con el fenotipo de comportamiento "Resiliente" o "Susceptible", se usó el protocolo de rechazo social (véase el apartado de Métodos).

Para identificar una verdadera conexión entre los miARN y sus UTR de 3' del gen diana tras el paradigma de rechazo social, se realizó una inmunoprecipitación (IP) del complejo Ago2, y se analizó la población de miARN y ARNm coprecipitados. Cuando se formó un miARN maduro, se incorporó al complejo RISC. Mientras está en el complejo RISC, Ago2 facilita la interacción entre un miARN específico y su UTR de 3' del ARNm [Meister G. *et al.*, *Molecular cell* (2004) 15:185-197] (Figura 17A).

Para verificar que el complejo Ago2 puede precipitarse realmente con su ARN unido, se realizó la IP en la amígdala de ratones sin tratamiento previo. La IP se realizó usando perlas magnéticas de proteína G que se hicieron reaccionar con anticuerpo monoclonal Ago2. Como se muestra en la Figura 17B, se precipitó una banda específica de Ago2 a partir de un extracto de células NIH 3T3 (Figura 17B, carril 1) o de un extracto de tejido de amígdala (Figura 17B, carril 2).

Para demostrar la especificidad de la IP, se dividió una muestra cerebral total en dos, donde una se precipitó con anti-Ago2 y la otra con un anticuerpo IgG1 no específico de control. Una banda de Ago2 específica estaba presente solo en el precipitado de Ago2 (Figura 17B, carriles 3, 4).

Por lo tanto, tirando hacia abajo del complejo Ago2 y analizando el miARN, así como las poblaciones de ARNm del material precipitado, había una mayor oportunidad de descubrir una conexión correcta entre un determinado miARN y su UTR de 3' de ARNm en regiones específicas del cerebro.

Aislamiento de ARN asociado a Ago 2 de amígdala de ratones sometidos a un paradigma de rechazo social

A continuación, basándose en los resultados específicos del experimento de IP de Ago2, se implementó la misma estrategia para revelar las posibles diferencias en el miARN y sus ARNm diana en el cerebro de ratones sometidos a un protocolo de rechazo social.

Tras 10 días del paradigma de rechazo social, se clasificaron los ratones en 3 grupos: Control, "Susceptible" y "Resiliente". Un ratón se caracterizó como "Sensible" cuando mostro la evitación social al encontrarse con un ratón nuevo de la misma cepa que lo atacó durante el paradigma de rechazo social. Un ratón fue caracterizado como "Resiliente" cuando no evitó al nuevo ratón agresivo e interaccionó con él. La mayoría de los ratones sometidos al rechazo social normalmente muestran evitación social y, por lo tanto, serían clasificados como "Susceptibles".

Aproximadamente solo se espera que del 10 al 20 % de los ratones de un experimento sean "Resilientes". A continuación, se muestra un ejemplo del ensayo de evitación social realizado.

Como se demuestra en la Figura 18A, se colocó solo el ratón en el laberinto social durante 3 minutos para su habituación. La cámara rastreó los movimientos del ratón por todo el laberinto. En la Figura 18C, se expuso el mismo ratón a un nuevo ratón ICR que se colocó más allá de un divisor. La cámara siguió al ratón en la esquina más alejada de la arena, lejos de la ubicación del nuevo ratón. Esta respuesta se consideró como de evitación social y, por lo tanto, este ratón fue clasificado como "Susceptible". Por el contrario, en la Figura 18B y Figura 18D el ratón no mostró evitación social, y por lo tanto, se clasificó como "Resiliente".

Se sometieron cuarenta ratones al paradigma de rechazo social y cuarenta ratones sirvieron de control. Tras el ensayo de evitación social, se seleccionaron 9 ratones "resilientes", 9 ratones "sensibles" y 12 ratones de control para la microdissección cerebral. Se recogieron muestras cerebrales 8 días después del ensayo de evitación social de la amígdala, BNST, PFC, rafe dorsal e hipocampo junto con la sangre del tronco.

Se combinaron 3 perforaciones de amígdala obtenidas de 3 ratones diferentes y se realizó la inmunoprecipitación con anti-Ago2. Después de la IP, se extrajo ARN del material precipitado. Después de la extracción de 3 amígdalas de cada grupo, había 3 muestras de ARN de los ratones "Resilientes", 3 muestras de ARN de los ratones "Susceptibles" y 4 muestras de ARN de los ratones de control - un total de 10 muestras de ARN. Se ensayó cada muestra en una micromatriz ST de ratón, así como en matriz de miARN (ambas de Affymetrix). Se examinaron los genes y los miARN regulados por aumento o por disminución en cada uno de los 2 grupos: "Susceptible" o "Resiliente" en relación con el grupo de control. Cuando se produjo una interacción entre un determinado miARN y un gen diana, los inventores esperaban una correlación opuesta en sus niveles totales. Sin embargo, se esperaba que el ARNm presente en el complejo RISC (precipitado con el anti-Ago2) estuviera en niveles altos debido a que aún no se había fragmentado; por lo tanto, al mirar los datos de la matriz, los inventores examinaban los miARN y las posibles dianas de ARNm que se regularon bien por aumento o disminución con respecto a la muestra de control, porque esto era una indicación de su interacción con el complejo RISC.

Resultados de las micromatrices

La Tabla 3, que se presenta a continuación, ilustra los resultados matriciales preliminares analizados usando filtros convencionales.

Tablas 3A-B: Lista de miARN de amígdala regulados por aumento (Tabla 3A) o por disminución (Tabla 3B) tras la IP con Ago2

(Tabla 3A)		
Regulado por aumento	Susceptible al cambio	Resiliente al cambio
mmu-miR-301a_st	1,96	2,11
mmu-miR-15a_st	1,66	1,87
mmu-miR-29a_st	1,42	1,82
mmu-miR-19b_st	1,97	2,34
mmu-miR-146b_st	1,55	1,94
mmu-miR-181d_st	1,54	1,64
mmu-miR-146a_st	1,41	1,60
mmu-miR-27b_st	1,45	1,91
mmu-miR-20a_st	1,57	1,52
mmu-miR-30a_st	1,34	1,65
mmu-miR-100_st	1,41	1,55
mmu-miR-153_st	1,44	1,92
mmu-miR-194_st	1,57	1,78
mmu-miR-30c_st	1,40	1,66
mmu-miR-23a_st	1,51	1,70
mmu-miR-106a_st	1,62	1,61
mmu-miR-30b_st	1,43	1,70
mmu-miR-195_st	1,59	1,98
mmu-miR-30e_st	1,36	1,56
mmu-miR-126-3p_st	1,58	1,76
mmu-let-7i_st	1,49	1,57
mmu-miR-434-5p_st	1,30	1,55
mmu-miR-376b_st	1,64	1,99
mmu-miR-495_st	1,45	1,82
mmu-miR-369-5p_st	1,60	1,77
mmu-miR-421_st	1,71	1,53
mmu-miR-543_st	1,52	1,69

mmu-miR-410_st	1,44	1,76
mmu-miR-34b-5p_st	2,18	1,53
(Tabla 3B)		
Regulado por disminución	Regulado por disminución	Regulado por disminución
mmu-miR-210_st	-1,59	-2,13
mmu-miR-298_st	-1,75	-2,08
mmu-miR-423-5p_st	-1,68	-1,94
mmu-miR-346_st	-1,74	-1,96
mmu-miR-139-3p_st	-1,71	-2,13
mmu-miR-320_st	-1,74	-2,03
mmu-miR-485_st	-1,53	-1,88
mmu-miR-491_st	-1,53	-2,01
mmu-miR-31_st	-1,30	-1,53
mmu-miR-92b_st	-1,20	-1,53
mmu-miR-93_st	-1,36	-1,50
mmu-miR-125a-3p_st	-1,32	-1,55
mmu-miR-134_st	-1,47	-1,63
mmu-miR-323-5p_st	-1,43	-1,76
mmu-miR-345-5p_st	-1,30	-1,62
mmu-miR-341_st	-1,36	-1,89
mmu-miR-370_st	-1,33	-2,04
mmu-miR-433_st	-1,49	-1,75
mmu-miR-455_st	-1,40	-1,61
*Para ambas Tablas 3A-B, los datos se presentan como el cambio para los ratones "Susceptibles" o "Resilientes" en comparación con el Control. Los valores en negrita están modificados significativamente.		

Varios miARN, que han sido regulados por aumento significativamente en los grupos de ratones "Susceptibles" y "Resilientes", se han seleccionado e ilustrado en un mapa térmico (véanse las Figuras 19A-B).

5 Matriz de expresión génica (ARNm)

Tabla 4: Lista de ARNm de amígdala regulados por aumento tras la IP con Ago2

Regulado por aumento	Susceptible al cambio	Resiliente al cambio
Tnrc18	1,36	1,23
Ifi30	1,34	1,21
Adamts9	1,79	1,52
Fkbp5	1,35	1,26
Adhl	1,42	1,05
Pxdn	1,32	1,19
Impdh2	1,41	1,02
Pdzd2	1,31	1,31
Csmd3	1,33	1,44
Usfl	1,33	1,20
A2m	1,71	1,09
Ccnd3	1,34	1,10
Rrh	1,33	1,02
Wfikkn2	1,40	1,07
Fras1	1,48	1,34
Notch2	1,50	1,22
Fam38a	1,33	1,18
Histlh3f	1,31	1,19
Fam167a	1,31	1,05
Calml4	1,68	1,11
Tspan4	1,30	1,21
Dnahc6	1,38	1,07
Jag2	1,31	1,19
Shank2	1,60	1,42
Dock6	1,33	1,10
Mamdc2	1,30	1,20
Sgms2	1,39	1,13
Iqub	1,51	1,11
Ubxn11	1,36	1,06
Wfdc2	1,53	1,11

Spef2	1,33	1,16
Fggy	1,31	1,14
Pcolce2	1,37	1,16
Thbs1	1,32	1,13
Dnahc7b	1,40	1,13
Nt5dc2	1,41	1,12
Slc4a2	1,34	1,07
Adamts17	1,40	1,35
Plscr2	1,34	1,21
Clic6	1,43	1,13
St6galnac2	1,38	1,08
Amigo2	1,33	1,06
Trio	1,33	1,15
Lamb1-1	1,35	1,20
Sema3b	1,40	1,01
Fap	1,39	1,10
Frem1	1,51	1,20
Pon1	1,34	1,03
Plin4	1,43	1,24
Steap1	1,36	1,10
Rdh5	1,52	1,13
Cldn2	1,56	1,11
Frrs1	1,37	1,10
Spef2	1,36	1,07
Sicola5	1,31	1,13
Ltc4s	1,35	1,17
Mfsd7c	1,37	1,14
Acss3	1,32	1,16
Hif3a	1,36	1,17
Serpinb8	1,40	1,18
Pcolce	1,36	1,16
Dnmt3a	1,20	1,19
GILZ (Tsc22d3)	1,19	1,15
Sdk2	1,29	1,36
Prg4	1,16	1,72
Fbn1	1,24	1,10
Slitrk6	1,11	1,28
Plxnal	1,30	1,16
Plxnb2	1,25	1,10
Sema4b	1,29	1,14
* Los datos se presentan como el cambio para los ratones "Susceptibles" o "Resilientes" en comparación con el Control. Los valores en negrita están modificados significativamente		

Tabla 5: Lista de ARNm de amígdala regulados por disminución tras la IP con Ago2

Regulado por disminución	Susceptible al cambio	Resiliente al cambio
Cyp2d10	-1,22	-1,34
Lonrf1	-1,32	-1,31
Btnl5	-1,64	-1,54
B2m	-1,33	-1,20
Tekt5	-1,36	-1,10
Prp2	-1,51	-1,02
Krtap5-1	-1,34	-1,10
Krtap5-4	-1,33	-1,10
Klhl38	-1,38	-1,07
Th	-1,42	-1,03
Pcsk9	-1,33	-1,20
Dnahc3	-1,39	-1,22
Sgpp2	-1,37	-1,03
Opalin	-1,49	-1,28

Se analizan varios posibles miARN y sus posibles dianas en el cerebro.

EJEMPLO 4A

miR-15a y miR-15b como reguladores de la respuesta al estrés

5 MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Extracción de ARN total

10 Se diseccionó tejido de la amígdala 90 minutos después del procedimiento de estrés agudo. Se aisló ARN total usando el kit miRNeasy (Qiagen) con el fin de preservar los miARN. Se transfirieron las perforaciones de cerebro congeladas a tampón de lisis y se homogeneizaron de inmediato. Se sometieron los cultivos primarios neuronales o cultivos de células N2a a lisis en pocillo, sobre hielo. El procesamiento posterior se realizó de acuerdo con la recomendación del fabricante. Los ARN extraídos se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

15 *Matriz de miARN*

Se ensayó la expresión diferencial de los miARN mediante micromatrices de miARN de Agilent (Agilent, Santa Clara, CA, EE.UU.) o Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la evaluación de la expresión diferencial de los miARN usando la matriz de Agilent, se marcaron 100 ng de ARN total por muestra (3 muestras de control y dos muestras de estrés agudo) y se hibridaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las matrices se rastrearon usando un escáner de micromatrices de Agilent. Los datos se extrajeron usando el software de extracción de funciones de Agilent v9 y se analizaron usando el paquete Partek® Genomics Suite (Partek Inc., St. Louis, Missouri, EE.UU.). Se sometieron los datos de los archivos GeneView.txt a transformación logarítmica y a normalización de cuantiles. Para la evaluación de la expresión diferencial de los miARN usando la matriz de Affymetrix, se marcó 1 µg de ARN total por muestra (dos muestras de control y dos muestras de estrés agudo) y se hibridó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se rastrearon las matrices usando un escáner de micromatrices de Affymetrix. Los datos se extrajeron usando el software de rastreo de Affymetrix y se normalizaron usando los parámetros por defecto del software miRNAQCtool de Affymetrix (ajuste de fondo, normalización de cuantiles, transformación logarítmica y determinación del umbral). Se importaron los datos normalizados de los cuatro archivos al software Partek Genomics. Se filtraron los genes no presentados en ninguna de las micromatrices. Debido a la diferencia en la distribución de los miARN, se eligieron diferentes puntos de corte de la relación logarítmica (correspondientes a aproximadamente 1 error típico para cada matriz) para cada matriz: 0,2 para Agilent y 0,4 para Affymetrix. Se compararon los miARN con las relaciones logarítmicas superiores al punto de corte entre las micromatrices, y se informa de los miARN comunes.

35 *Clonación de las UTR de 3' en el plásmido de expresión de luciferasa Psichck2*

Se amplificó la secuencia de UTR de 3' de CRFR1 por PCR a partir de ADN genómico de ratón. Se ligaron los fragmentos de PCR de la UTR de 3' en el vector pGEM-T easy (Promega) de acuerdo con las directrices del fabricante, y se subclonaron además en un único sitio *NotI* en el extremo 3' de la luciferasa del plásmido indicador Psichck2 (Promega). La orientación de la clonación se verificó mediante cortes de diagnóstico y por secuenciación.

Transfecciones y ensayo de luciferasa

45 Se cultivaron células HEK293T sobre poli-L-lisina en un formato de 48 pocillos hasta una confluencia del 70-85-% y se transfectaron usando polietilenimina con los siguientes plásmidos: Plásmido Psichck2-3'UTR, sobreexpresión de pre-mmu-miR-15 en el plásmido pEGFP o plásmido pEGFP solo (clontech). 24 horas después de la transfección, se sometieron las células a lisis y se ensayó la actividad de los indicadores de luciferasa como se ha descrito previamente

50 [Chen A. *et al. Mol Endocrinol* (2005) 19: 441-58]. Se normalizaron los valores de luciferasa de Renilla con respecto a los niveles de luciferasa de luciérnaga de control (transcripción a partir del mismo vector, pero sin afectar por la UTR de 3' ensayada) y se promediaron a lo largo de seis repeticiones de pocillos por condición.

RESULTADOS

55 miR-15a y miR-15b surgieron como regulados por aumento 90 minutos después del estrés de restricción aguda (Figura 7A-B). Se predijo, mediante bioinformática, que tanto el miR-15a como el miR-15b se dirigirían a la UTR de 3' de CRFR1 diana (Figura 7C). La sobreexpresión *in vitro* de miR-15b en células HEK293T redujo significativamente los niveles de expresión de luciferasa controlados por la UTR de 3' de CRFR1 (Figura 7D).

60

EJEMPLO 4B

El efecto de miR15 sobre FKBP5

5 MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Como se ilustra en el Ejemplo 4A del presente documento anterior.

10 RESULTADOS

De acuerdo con los resultados de la matriz, miR-15a y la proteína 5 de unión a FK506 (también conocida como FKBP5) se regularon ambas por aumento en los ratones "Susceptibles" y "Resilientes" en relación con el grupo de control (Figuras 20A-B), sugiriendo su regulación por aumento en el complejo RISC como resultado del estrés crónico.

Los estudios genéticos han identificado un papel para FKBP5 en el trastorno de estrés postraumático, la depresión y la ansiedad. Por ejemplo, se ha encontrado que los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en FKBP5 interaccionan con el trauma de la infancia para predecir la gravedad del trastorno de estrés postraumático en adultos (PTSD) [Binder, E.B. *et al.*, *Nature genetics* (2004) 36:1319-1325]. Estos hallazgos sugieren que los individuos con estos SNP que sufren abuso en su infancia son más susceptibles al PTSD como adultos. También se ha encontrado que la FKBP5 está menos expresada en los individuos con PTSD actual [Yehuda, R. *et al.*, *Biological psychiatry* (2009) 66:708-711]. Se ha encontrado que el gen FKBP5 tiene múltiples sitios de poliadenilación y está estadísticamente asociado con una mayor tasa de trastornos depresivos [Binder *et al. supra*].

Un análisis adicional de la UTR de 3' de FKBP5 reveló que tiene una secuencia de apareamiento semilla conservada hacia miR-15 (Figura 20C).

Si, de hecho, miR-15a regula el ARNm de FKBP5, era de esperar que, mientras tanto miR-15a como FKBP5 fueran regulados por aumento en el precipitado de Ago-2 (como se muestra por los resultados de las micromatrices, Fig. 20B), los niveles totales de ARNm o proteína de FKBP5 en la muestra de amígdala se reducirían.

Para examinar si la interacción entre miR-15a y FKBP5 tiene lugar en la amígdala, se realizó un análisis de PCR en tiempo real en la muestra de ARN total obtenida de la amígdala de ratones "Susceptibles" y de control. Como se muestra en las Figuras 21A-B, los niveles de miR-15a se aumentaron en el ARN total extraído de ratones susceptibles mientras que los niveles de FKBP5 disminuyeron. Estos resultados indicaron que miR-15a reprime los niveles de FKBP5 en la amígdala tras una condición de estrés crónico.

Se realiza la clonación de las formas de UTR de 3' intactas y mutadas de FKBP5 para el análisis del ensayo de luciferasa con el fin de encontrar si una interacción directa entre miR-15a y FKBP5 se produce *in vitro*.

Además de FKBP5, miR-15 puede regular potencialmente una serie de genes que están implicados en la respuesta al estrés, incluyendo Stx1a (syntaxina 1a), Sgk1 (quinasa regulada por suero/glucocorticoide) y Adrb2 (Figura 22).

45 EJEMPLO 4C

miR-181 regula los receptores de glutamato

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

50 Clonación de las UTR de 3' en el plásmido de expresión de luciferasa Psicheck2

Se amplificaron las secuencias de UTR de 3' de Grm1, Grik3, Grm5, Grik2 y Grm7 por PCR a partir de ADN genómico de ratón. Se ligaron los fragmentos de PCR de la UTR de 3' en el vector pGEM-T easy (Promega) el vector pJET1.2 (Fermentas) de acuerdo con las directrices del fabricante, y se subclonaron además en un único sitio *NotI* o *XhoI* en el extremo 3' de la luciferasa del plásmido indicador Psicheck2 (Promega). La orientación de la clonación se verificó mediante cortes de diagnóstico y por secuenciación.

Rechazo social crónico

60 Se sometieron los ratones a un protocolo de rechazo social según lo descrito previamente [Krishnan V. *et al. Cell* (2007) 131: 391-404]. En resumen, se colocaron los ratones en una jaula de un ratón ICR agresivo y se dejaron interaccionar físicamente durante cinco minutos. Durante este tiempo, el ratón ICR atacó al ratón intruso, y el intruso mostró una postura subordinada. Después, se colocaron unos divisores perforados de plexiglás transparente entre los animales, y los ratones permanecieron en la misma jaula durante 24 horas para permitir el contacto sensorial. El procedimiento se repitió entonces con un ratón ICR desconocido durante cada uno de los siguientes 10 días.

RESULTADOS

Los niveles de miR-181d fueron significativamente superiores en los ratones que padecieron estrés crónico (Figura 23). En un intento por encontrar interacciones entre miR-181 y las posibles dianas de ARNm, los inventores descubrieron que miR-181 puede regular muchos tipos de receptores de glutamato. En general, los receptores de glutamato se pueden dividir en dos grupos, los receptores de glutamato ionotrópicos (iGluR), que forman el poro del canal iónico que se activa cuando el glutamato se une al receptor, y los receptores de glutamato metabotrópicos (mGluR), que activan indirectamente los canales iónicos en la membrana plasmática a través de una cascada de señalización en la que participan las proteínas G.

De los muchos subtipos específicos de receptores de glutamato, es habitual referirse a los subtipos primarios por un producto químico que se une al mismo más selectivamente que el glutamato. La investigación, sin embargo, está en curso, ya que se identifican subtipos y se miden las afinidades químicas. Varios compuestos se usan rutinariamente en la investigación de los receptores de glutamato y se asocian con subtipos de receptores:

Tabla 6: Receptores de glutamato clasificados en subgrupos

Nombre	Tipo
Receptor de NMDA	Ionotrópico
Receptor de kainato	
Receptor de AMPA	
mGluR	Metabotrópico

Como se ilustra en las Figuras 24 y 25, de entre todas las dianas predichas conservadas de miR-181, hay 6 receptores de glutamato (Grm1, Grik3, Grm5, Gria2, Grik2 y Grm7).

Se ha demostrado previamente que miR-181a controla la expresión superficial de Gria2 en las neuronas del hipocampo [Saba. R. *et al.*, "Molecular and Cellular Biology" (2012) 32(3):619-32]. Se están realizando ensayos de luciferasa con el fin de verificar la interacción miARN-ARNm. Además, se cruzan una línea condicional de ratones miR-181 KO con una línea específica, obteniéndose de este modo una eliminación de miR-181 en núcleos cerebrales específicos.

EJEMPLO 5A

miR-182, un excelente sintonizador de la actividad neuronal normal y del comportamiento psicopatológico

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Clonación de las UTR de 3' en el plásmido de expresión de luciferasa Psichack2

Se amplificó la secuencia de UTR de 3' de Htr1a por PCR a partir de ADN genómico de ratón. Se ligaron los fragmentos de PCR de la UTR de 3' en el vector pGEM-T easy (Promega) de acuerdo con las directrices del fabricante, y se subclonaron además en un único sitio *NotI* en el extremo 3' de la luciferasa del plásmido indicador (Promega). La orientación de la clonación se verificó mediante cortes de diagnóstico y por secuenciación.

Transfecciones y ensayo de luciferasa

Se cultivaron células HEK293T sobre poli-L-lisina en un formato de 48 pocillos hasta una confluencia del 70-85-% y se transfectaron usando polietilénimina con los siguientes plásmidos: Plásmido Psichack2-3'UTR, sobreexpresión de pre-mmu-miR-182 en el plásmido pEGFP o plásmido pEGFP solo (clontech). 24 horas después de la transfección, se lisaron las células y se ensayó la actividad de los indicadores de luciferasa como se ha descrito previamente [Chen A. *et al. Mol Endocrinol* (2005) 19: 441-58]. Se normalizaron los valores de luciferasa de Renilla con respecto a los niveles de luciferasa de luciérnaga de control (transcripción a partir del mismo vector, pero sin afectar por la UTR de 3' ensayada) y promediados a lo largo de seis repeticiones de pocillos por condición.

Rechazo social crónico

Se sometieron los ratones a un protocolo de rechazo social según lo descrito previamente [Krishnan V. *et al. Cell* (2007) 131: 391-404]. En resumen, se colocaron los ratones en una jaula de un ratón ICR agresivo y se dejaron interactuar físicamente durante cinco minutos. Durante este tiempo, el ratón ICR atacó al ratón intruso, y el intruso mostró una postura subordinada. Después, se colocaron unos divisores perforados de plexiglás transparente entre los animales, y los ratones permanecieron en la misma jaula durante 24 horas para permitir el contacto sensorial. El procedimiento se repitió entonces con un ratón ICR desconocido durante cada uno de los siguientes 10 días.

Microdissección del núcleo del rafe y recogidas de plasma

Se tomaron muestras cerebrales de núcleo de rafe (RN) de ratón tras extirpar el cerebro y colocarlo en una matriz acrílica de cerebro (Stoelting). Los cortes se recogieron usando cuchillas de afeitar convencionales (GEM) basándose en marcadores anatómicos designados. Se usaron jeringas 14G romas para extraer la región RN de cortes de 3 mm extraídos de la matriz.

Purificación de microARN y análisis de expresión por RT-PCR cuantitativa

Se aislaron ARNm, incluyendo microARN, de neuronas clasificadas, punzones cerebrales congelados y plasma usando el mini kit miRNeasy (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se trataron usando miARN del kit miScript de transcripción inversa para generar ADNc. A continuación, se analizaron las muestras de ADNc usando el kit de PCR SYBR®Green (Qiagen) de acuerdo con las directrices del fabricante en el termociclador AB 7500 (Applied Biosystems). Se usaron cebadores específicos para cada miR junto con el cebador universal comercial, mientras que se usó ARNs de U6 como control interno.

Clonación de vector vírico de sobreexpresión de miR182

Se amplificó por PCR pre-miR-182 a partir de ADN genómico de ratón con cebadores añadiendo sitios *AgeI* de enzima de restricción y luego se incubó en el vector pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI). Después de la secuenciación de pGEM-T Easy y la digestión de ambos vectores pGEM-T Easy y pEGFP (Clontech Laboratories Inc., Mountain View, CA) con el *AgeI*, se ligó la secuencia prematura de miR-182 al vector pEGFP para construir el plásmido de expresión PEGFP-miR-182. Posteriormente, se cortó pEGFP-miR-182 mediante *BamHI* y *BsrGI* en paralelo con el plásmido pCSC-E/Syn-eGFP de corte con las mismas enzimas, y se ligó la secuencia de miR-182-eGFP a pCSC-E/Syn para construir el plásmido pCSC-eSNY-pre-miR-182-eGFP, que se confirmó mediante análisis de endonucleasa de restricción y secuenciación de ADN.

Producción de vectores lentivíricos

Se produjeron lentivirus recombinantes por transfección transitoria en células HEK293T, como se ha descrito previamente [Naldini L *et al.*, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* (1996) 93:11382-8]. En resumen, se cosecharon los lentivirus infecciosos a las 48 y 72 horas después de la transfección, se filtraron a través de filtros de acetato de celulosa de 0,45 µm de poro y se concentraron por ultracentrifugación.

RESULTADOS

Hasta la fecha, se informó de miR-182 principalmente en los estudios relacionados con el cáncer, tales como células de adenocarcinoma de pulmón humano, glioma, cáncer de mama, cáncer de vejiga, melanoma y reparación del ADN. Además, miR-182 resultó participar en procesos de desarrollo tales como el oído interno y el desarrollo de la retina, y en el sistema inmunológico en la activación de los linfocitos T, y en la enfermedad del lupus. En el sistema nervioso, miR-182 se implicó en los ganglios de la raíz dorsal de rata específicos de los órganos sensoriales y como un modulador del reloj circadiano, mientras que se encontró una correlación entre las variantes genéticas de pre-miR-182 en pacientes con depresión mayor [Saus E *et al.*, *Hum Mol Genet.* (2010) 19(20):4017-25]. Además, miR-182 se enumeró entre otros 12 miR como regulado por disminución en la corteza prefrontal de ratas macho de comportamiento resiliente a comportamiento de indefensión aprendido [Smalheiser N. R. *et al.*, *Int J Neuropsychopharmacol.* (2011) 1-11].

El análisis bioinformático de la UTR de 3' de Htr1a realizado como parte de los análisis de micromatrices de miR 5HT implicó una posible dirección de este gen por miR-182. Por lo tanto, los inventores realizaron ensayos *in vitro* a través de un ensayo de luciferasa, que reveló una fuerte represión de la UTR de 3' de Htr1a por miR-182 (Figura 8). Aparecieron dos secuencias de apareamiento semilla conservadas para miR-182 aparecieron en la UTR de 3' de ratones Htr1a.

Los estudios de regulación indicaron una fuerte tendencia a la regulación por disminución de los niveles de expresión de miR-182 en el RN de ratones macho adultos expuestos a rechazo social crónico en comparación con los controles (Figura 9), lo que sugiere la participación de miR-182 en la respuesta molecular al estímulo ambiental conocido como comportamientos de tipo depresivo inducidos.

Un análisis bioinformático adicional de generación de predicciones de dirección para miR-182 en dos bases de datos reveló una larga lista de posibles dianas, incluyendo genes relacionados con la actividad neuronal tanto en condiciones normales como patológicas (Figura 10).

Para ensayar mejor el miR-182 *in vitro* para la identificación de las interacciones específicas de miR-diana, y para revelar el papel de miR-182 en la regulación de los comportamientos normales y patológicos *in vivo*, se desarrollaron sistemas de plásmidos y lentivirus para la manipulación de miR-182. Se fabricaron lentivirus de sobreexpresión específicos neuronales (Figura 11A) y se ensayaron *in vitro* en la estirpe celular neuronal N2a. Estos resultados demostraron un aumento de los niveles de miR-182 en las células infectadas con lentivirus de sobreexpresión de

miR-182 en comparación con el control (Figura 11B). Se adquirió la secuencia de plásmido desactivada específica de miR-182 denominada miArrest (Genecopoeia, Rockville, MD, EE. UU., Figura 11C) se subclonó en construcciones víricas (Figura 11C). Estos sistemas se ensayan en cultivo celular y por inyección específica de sitio en cerebros de ratones adultos.

Se desarrollan ratones nulos para miR-182 con el fin de investigar el papel de los miR en el desarrollo de la retina. Recientemente, los inventores obtuvieron parejas de reproducción para esta línea, y en una generación, una colonia, miR-182 KO y sus compañeros de camada WT están siendo fenotipados de forma conductual y fisiológica.

EJEMPLO 5B

Regulación de los niveles de expresión de miR182 por estrés agudo

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Como se describe en el Ejemplo 5A anterior del presente documento.

RESULTADOS

Se examinó el efecto del estrés agudo sobre el nivel de miR182. Como se ilustra en la Figura 26, el estrés agudo de inmovilización condujo a la disminución de los niveles de expresión de miR182 el núcleo del rafe (RN) de los ratones 24 horas después de la inducción del estrés ($p < 0,01$). miR182 demostró niveles de expresión reducidos en el núcleo del rafe, tanto tras el estrés agudo como crónico, lo que sugiere que tiene un papel en la modulación de las respuestas moleculares al estrés en el núcleo del rafe, posiblemente mediante la aplicación de su gen diana Httla modulando los niveles de 5-HT en la sinapsis.

Ensayo de interacción miR-diana para genes diana predichos de miR182

Usando un ensayo de luciferasa, se examinaron once genes diana predichos de miR182, escogidos tras un amplio análisis bioinformático, (Figura 27A). Se ensayaron las UTR de 3' de los genes diana *in vitro* para comprobar si miR182 tiene un efecto represor medido por la actividad del gen indicador conjugado de la luciferasa. De los once genes ensayados, tres genes: Dscam (molécula de adhesión celular del síndrome de Down), L1cam (molécula de adhesión celular L1) y Tsnax (proteína X asociada a Translin) habían demostrado un efecto represor por miR182 como en el ensayo de luciferasa (Figura 27A). Cuando se ensayó la UTR de 3' del gen diana de miR182 mencionado anteriormente, se observó una secuencia de apareamiento semilla conservada para miR182 tanto en Tsnax, como en L1cam y Dscam, lo que sugiere que esta interacción de miR-diana tenía un papel funcional (datos no mostrados).

A continuación, se verificó el efecto represor directo de miR182 sobre estos tres genes. Por lo tanto, se mutaron las UTR de 3' para eliminar la secuencia de apareamiento semilla miR182 y se compararon las UTR de 3' normales con las mutadas *in vitro* mediante ensayos de la luciferasa. Se inhibió el efecto represor de miR182 sobre L1cam cuando se mutó su secuencia de apareamiento semilla (Figura 27B) y, de manera similar, se inhibió el efecto de miR182 en Tsnax en la UTR de 3' mutada (Figura 27C), indicando que miR182 se dirigió directamente a este gen. Se realizan verificaciones similares para Dscam y Htr1a con las UTR de 3' mutadas.

Se usa un modelo de ratones carente de miR182 para estudiar la interacción entre miR182 y sus genes diana *in vivo*. Los inventores están examinando el fenotipo de comportamiento de ratones miR182KO en ensayos de comportamiento social, aprendizaje y memoria, y comportamientos esquizofrénicos.

EJEMPLO 6

Regulación de los niveles de miR135 en el plasma y el cerebro de ratones adultos

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Clonación de vectores víricos de sobreexpresión de miR135 y de vectores víricos de miR135 KD

Se adquirieron el plásmido miR135b KD pEZX-H1-miR135KD-CMV-mCherry y de control pEZX-H1-control KD-CMV-mCherry en GeneCopeia (EE.UU.). Se amplificaron el promotor H1 y la secuencia KD usando cebadores con sitio *NheI* de flanqueo, y se ligaron a pGEM-T Easy. Tras la secuenciación de pGEM-T Easy y la digestión tanto de pGEM-T Easy como de p156-pRRL-CMV-GFP con el sitio *NheI*, se ligaron H1-KD miR y p156 con muesca para generar p156-pRRL-H1-miR135bKDCMV-GFP y p156-pRRL-H1-control KD-CMV-GFP.

Evaluaciones del comportamiento

Todas las evaluaciones del comportamiento se realizaron durante la fase oscura después de la habituación a la sala de ensayo durante 2 horas antes de cada ensayo.

Ensayo de transferencia de luz/oscuridad

El aparato de ensayo de transferencia de luz/oscuridad y las condiciones experimentales fueron como se han descrito anteriormente. En resumen, el aparato contenía 2 cámaras, una cubierta oscura, en la que se colocaron los ratones al comienzo del ensayo, y una cámara brillantemente iluminada, a la que se puede transferir libremente durante el ensayo de 5 minutos. Se cuantificaron el tiempo transcurrido en el compartimiento de la luz, la distancia recorrida en la luz, la latencia hasta la vista a la cámara de luz y el número de transiciones de luz-oscuridad con un sistema de seguimiento de video (VideoMot2, TSE Systems, Bad Hamburg, Alemania).

Ensayo de campo abierto

El ensayo de campo abierto se realizó en una caja blanca de 50 x 50 x 22 cm, iluminada en 120 lux, en la que los ratones se pusieron para un ensayo de 10 minutos. Se cuantificaron tiempo transcurrido en el centro, el número de visitas al centro, la latencia hasta la visita al centro, el número de retrocesos y la distancia total recorrida mediante un sistema de seguimiento de video (VideoMot2, TSE Systems, Bad Hamburg, Alemania).

Ensayo de laberinto elevado con forma de cruz

Este aparato de ensayo tenía una forma de cruz y contenía 2 paredes de barrera y 2 brazos abiertos muy poco iluminados (6 lux). Se registraron automáticamente el número de entradas, la distancia recorrida y el tiempo pasado en los brazos abiertos usando el sistema de seguimiento de video (VideoMot2, TSE Systems, Bad Hamburg, Alemania) durante el ensayo de 5 minutos.

RESULTADOS

Se ensayaron los efectos de la administración de antidepresivos en los niveles de miR135 en sitios cerebrales conocidos por ser inervados por las neuronas serotoninérgicas del RN y participar en la regulación del estado de ánimo, la amígdala (AMÍ) y la corteza prefrontal (PFC). En la amígdala ambas variantes de miR135 fueron reguladas por aumento por los inhibidores de la recaptación de la serotonina (SSRI) y los inhibidores de la recaptación de la noradrenalina (NRI) agudos, pero no por la administración crónica de estos fármacos ($p = 0,0001$ para SSRI; $p = 0,003$ para NRI para miR135a; Figura 28A; $p = 0,0001$ para SSRI y $p = 0,003$ para NRI para miR-135b, Figura 28B). En el PFC, los niveles de miR135b fueron regulados por aumento mediante la administración aguda de SSRI y NRI ($p = 0,0183$ para SSRI y $0,0013$ para NRI [Figura 28c]), pero los niveles de miR135a no fueron significativamente alterados (Figura 28D). Además, el SSRI crónico condujo a la reducción de los niveles de miR135a y miR135b en el PFC ($p = 0,0241$ para miR135a (Figura 28C) y $p = 0,0067$ para miR135b (Figura 28D)).

Además, se ensayaron los niveles de miR135 en la circulación siguiendo el paradigma del rechazo social. Los niveles de miR135a ($p = 0,0089$, Figura 29A) y miR135b ($p = 0,0033$, Figura 29B) aumentaron en el plasma de los ratones expuestos al rechazo social crónico en comparación con los ratones de control según se midió en la PCR en tiempo real. Por lo tanto, los presentes resultados demostraron que el miR135 en plasma se reguló por aumento después del estrés crónico, conocido por inducir comportamientos de tipo depresivo en ratones, se redujo enormemente mediante la administración de antidepresivos. Estos hallazgos sugieren niveles de miR135 en el plasma como biomarcador para los estados depresivos relacionados con los serotoninérgicos.

EJEMPLO 7

Establecimiento del sistema de desactivación de miR135; clonación, generación de lentivirus y validaciones *in vitro* e *in vivo*

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Clonación del vector vírico miR135 KD

Se adquirieron el plásmido miR135b KD pEZX-H1-miR135KD-CMV-mCherry y de control pEZX-H1-control KD-CMV-mCherry en GeneCopeia (EE.UU.). Se amplificaron el promotor H1 y la secuencia KD usando cebadores con sitio *NheI* de flanqueo, y se ligaron a pGEM-T Easy. Tras la secuenciación de pGEM-T Easy y la digestión tanto de pGEM-T Easy como de p156-pRRL-CMV-GFP con el sitio *NheI*, se ligaron H1-KD miR y p156 con muesca para generar p156-pRRL-H1-miR135bKDCMV-GFP y p156-pRRL-H1-control KD-CMV-GFP. RESULTADOS

Para evaluar el efecto de la disminución de los niveles de miR135 en el RN en los ratones con comportamientos relacionados con 5-HT, se utilizó un inhibidor de miR135b basado en plásmido, y se ensayó su eficiencia en un

ensayo de luciferasa. En este ensayo, se cotransfectaron células HEK293T con plásmidos miR135OE, miR135KD y UTR de 3', y se ensayó la capacidad del plásmido miR135bKD para bloquear el efecto de represión de miR135 en la UTR de 3' de Slc6a4 y Htr1a. Se bloqueó el efecto represor de miR135b de la UTR de 3' de Htr1a mediante al plásmido miR135KD (Figura 30A). Del mismo modo, se bloqueó el efecto de miR135b sobre la UTR de 3' de Slc6a4 mediante miR135KD (Figura 30B). Estos resultados indican que el plásmido miR135KD bloquea realmente la actividad biológica de miR135.

Se subclonaron la secuencia de miR135KD y una secuencia de control en un vector vírico (Figura 30C) y se generaron lentivirus que expresaban la secuencia de desactivación (KD) diferente. Para ensayar la capacidad de los lentivirus para infectar el tejido cerebral, se infectaron los RN de los ratones con cualquiera de los lentivirus. De hecho, la infección causó la expresión de GFP (Figuras 30D-E), lo que demuestra la capacidad de los lentivirus miR135bKD para infectar el tejido cerebral.

EJEMPLO 8

Efectos en el comportamiento de la desactivación de miR135 en el RN de ratones adultos

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Evaluaciones del comportamiento

Los ratones se caracterizaron conductualmente usando los ensayos para comportamientos de ansiedad y depresión como se describe en el Ejemplo 6 anterior.

RESULTADOS

Tras la validación *in vitro* e *in vivo* de los lentivirus miR135KD, se usaron para manipular los niveles de miR135 en el RN y para ensayar su efecto en el comportamiento de los ratones. Se inyectaron ratones adultos con lentivirus miR135KD o con lentivirus de control KD en el RN y, después de un período de recuperación, se analizaron los comportamientos de ansiedad y depresión. Dado que miR135 reprime los reguladores negativos de 5-HT, era de esperar que miR135KD condujera a la reducción de los niveles de 5-HT en la sinapsis y por eso a un aumento de los comportamientos de tipo ansiedad y depresión.

En el ensayo de campo abierto, no se observaron diferencias entre los grupos (Figura 31 A), sin embargo en el ensayo de laberinto elevado en forma de cruz, los ratones miR135KD demostraron un comportamiento de tipo ansiedad demostrando una tendencia a pasar menos tiempo en los brazos abiertos ($p = 0,0644$) y a visitar menos veces los brazos abiertos ($p = 0,0572$, Figura 31B). Además, los ratones miR135KD caminaron significativamente menos distancia en los brazos abiertos ($p = 0,0433$) y tuvieron una mayor tendencia a visitar los brazos abiertos ($p = 0,0124$, Figura 31B). De manera similar, en el ensayo de oscuridad-luz realizado en condiciones de estrés basal, los ratones miR135KD demostraron un comportamiento de ansiedad significativamente mayor en comparación con los controles, pasando menos tiempo en la luz ($p = 0,0454$, Figura 31C), visitando menos veces la cámara de luz ($p = 0,0107$, Figura 31D) y caminando una distancia menor en la cámara de luz ($p = 0,0402$ s, Figura 31E). Los resultados demostraron una disminución de los niveles de miR135 40 min y 24 horas después del estrés agudo (Figura 30A-B). Por lo tanto, la teoría actual era que los ratones miR135KD estresados no diferirían de sus controles en los comportamientos de ansiedad cuando se ensayaran después del estrés agudo, ya que los ratones de control también tendrían una disminución de los niveles de miR135 debida al estrés. De hecho, no hubo diferencia entre los grupos cuando se volvió a realizar el ensayo de transferencia oscuridad-luz en ninguno de los parámetros, tanto cuando se realizó 40 minutos como 24 horas después del estrés agudo (Figura 31C-E).

Se ensayaron los comportamientos de tipo depresión de miR135KD tanto en condiciones basales como después de la manipulación farmacológica. Dado que los niveles de miR135 mostraron un aumento en el RN después de la administración de SSRI (Figura 31E), se especuló que la reducción de los niveles de miR135 puede conducir a una respuesta reducida hacia SSRI. En el ensayo de suspensión por la cola realizado tanto en los niveles basales como después de la administración de SSRI, no hubo diferencias entre los ratones miR135b KD y los ratones KD de control en el tiempo de inmovilidad (Figura 31F), y se observó la disminución esperada del tiempo de inmovilidad debido al tratamiento con SSRI ($p < 0,0008$). Sin embargo, en el ensayo de natación forzada, además del efecto principal para la inyección de SSRI ($p < 0,0001$), los ratones miR135KD inyectados con SSRI fueron más inmóviles en los últimos 2 minutos del ensayo en comparación con los ratones KD de control ($p = 0,0141$, 5 minutos, $p = 0,0404$, 6 minutos, sugiriendo la Figura 31G la atenuación de los efectos antidepresivos de SSRI mediante la reducción de los niveles de miR135 en el RN. Este resultado implica que miR135 forma parte de la alternación endógena que conduce a cambios de comportamiento causados por el SSRI.

EJEMPLO 9

Sobreexpresión de miR135 en neuronas 5-HT

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Se compararon los ratones con sobreexpresión de miR135a en las neuronas 5-HT con los controles de la misma camada tanto en los niveles de expresión de miR135 como de sus genes diana y en cuanto al comportamiento.

RESULTADOS

Se ensayaron los efectos de la manipulación de los niveles de miR135 específicamente en las neuronas 5-HT en el RN de los ratones para comportamientos de tipo ansiedad y depresión. Con este fin, se desarrolló un sistema genético usando el sistema Cre-loxP. En concreto, se obtuvo la especificidad de 5-HT usando los ratones Cre ePet Cre que expresaban la Cre recombinasa específicamente en las neuronas 5-HT positivas del RN, y se realizó la sobreexpresión de miR135 cruzando la línea Cre específica de 5-HT (ePet Cre) con la línea transgénica de ratón con sobreexpresión condicional para miR135a (Figura 32).

Se ensayó el nivel de expresión de miR135 en el RN de ratones con sobreexpresión de miR135 específicamente en las neuronas 5-HT (miR135OE) mediante PCR en tiempo real para miR135, y se comparó con los ratones de control, positivos para el alelo de sobreexpresión condicional de miR135, pero negativos para ePet CRE. Los ratones miR135OE demostraron casi el doble de sobreexpresión en comparación con los ratones de control (Figura 33A, $p < 0,05$). Los niveles de sobreexpresión de miR135 fueron similares a los niveles medidos en el RN de los ratones después de la administración de SSRI, lo que sugiere que esta línea de ratones fue un buen modelo para estudiar las características de los antidepresivos de miR135. Además, el ARNm del gen diana miR135, Slc6a4 (Figura 33B, $p < 0,05$) y Htr1a (Figura 33C, $p < 0,1$) se regularon por disminución en el RN de los ratones miR135OE en comparación con el control, demostrando la represión *in vivo* por miR135 de sus genes diana.

Para ensayar la sobreexpresión de miR135 específicamente en neuronas 5-HT, se expusieron ratones miR135OE y sus controles de la misma camada al paradigma del rechazo social crónico, un procedimiento conocido para inducir comportamientos de tipo depresión y ansiedad, y posteriormente se ensayaron para los comportamientos de tipo ansiedad y depresión.

Los ratones miR135OE mostraron comportamientos aumentados de ansiedad después del rechazo social en comparación con los controles de la misma camada. En el campo abierto, se observó una tendencia al aumento de la ansiedad en el tiempo de los ratones miR135OE y en el número de visitas al centro ($p < 0,1$, Figura 34A). Mientras que en la transferencia de oscuridad-luz, los ratones miR135OE pasaron más tiempo en la luz ($p < 0,05$, Figura 34B) y pasaron menos tiempo en la cámara de luz ($p < 0,01$, Figura 34B). Se observaron resultados similares en el laberinto en cruz elevado ($p < 0,05$, Figura 34B), mientras que los ratones miR135OE pasaron más tiempo en los brazos abiertos ($p < 0,05$, Figura 34C) y recorrieron mayor distancia en los brazos abiertos ($p < 0,05$, Figura 34C).

Los comportamientos de tipo depresivo de ratones miR135OE tras el rechazo social fueron menores que los controles de la misma camada. En el ensayo de suspensión por la cola, se observó una tendencia hacia la disminución del tiempo de inmovilidad de los ratones miR135OE en comparación con los controles ($p < 0,1$, Figura 34D), junto con un tiempo de inmovilidad significativamente reducido en el ensayo de natación forzada ($p < 0,05$, Figura 34E).

Aunque la invención se ha descrito en combinación con realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para los expertos en la materia.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Yeda Research and Development Co. Ltd. Chen, Alon Hornstein, Eran Issler, OARN Haramati, Sharon Volk, Naama

<120> MICRO-ARN Y COMPOSICIONES QUE LOS COMPRENDEN PARA EL TRATAMIENTO Y EL DIAGNÓSTICO DE AFECCIONES MÉDICAS ASOCIADAS CON LA SEROTONINA, ADRENALINA, NORADRENALINA, GLUTAMATO Y HORMONA LIBERADORA DE CORTICOTROPINA

<130> 54322

<150> US 61/514.954

<151> 04-08-2011

<160> 157

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

 10 <400> 1
 tatggctttt tattcctatg tga 23

 15 <210> 2
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

 20 <400> 2
 tatggctttt cattcctatg tga 23

 25 <210> 3
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

 <400> 3
 ttgttcgtt cggctcgcgt ga 22

 35 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 40 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

 <400> 4
 gatgacacgc aaattcgtga a 21

 45 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

 55 <400> 5
 taaggcacgc ggtgaatgcc 20

 60 <210> 6
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

 65 <400> 6
 agttctgccg ctgatgatg 19

5	<210> 7 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
10	<400> 7 gcacaaatgg agagtctgat taaa	24
15	<210> 8 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
20	<400> 8 tgctttaat gcaaacacgc	20
25	<210> 9 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
30	<400> 9 ccaagtttac aaccatcaag ca	22
35	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
40	<400> 10 atccgcatga atgctgtgta	20
45	<210> 11 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
50	<400> 11 gtgggtggtg gaagagacac	20
55	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario	
60	<400> 12 cctacacgca gagcattgaa	20

5 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

 10 <400> 13
 acatccctgt gggatttgag 20

 <210> 14
 <211> 25
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

 20 <400> 14
 tgtcttgctt atattttctc agtag 25

 <210> 15
 <211> 26
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 30
 <400> 15
 gaaaatataa gcaagacatc cctggt 26

 <210> 16
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario
 40
 <400> 16
 aaagatccct ttcccaatg 20

 45 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

 <400> 17
 55 cagtgcgtct tctccacaga 20

 <210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

 <400> 18
 65 ataagcaagg gcccaaaagg aaga 24

5
 <210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

15
 <400> 19
 ttttgggcc ttgctataa gtcc 24

20
 <210> 20
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

30
 <400> 20
 ctgccctgcc acatgtgtt ttat 24

35
 <210> 21
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

45
 <400> 21
 taacaaataa aaacacatgt ggca 24

50
 <210> 22
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

60
 <400> 22
 accggtcata tgattccca gtttctgct tt 32

65
 <210> 23
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

70
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

75
 <400> 23
 accggtctc tgggctggt ccttag 26

80
 <210> 24
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*

85
 <400> 24
 aguguaucuu uauuuuucgg uau 23

<210> 25
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*
 5
 <400> 25
 acagggau gu cuugcuagcc aua 23
 10
 <210> 26
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*
 15
 <400> 26
 aguguauc cu uacuuuucgg uau 23
 20
 <210> 27
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 27
 cugcccugcc acaugaagcc auu 23
 25
 <210> 28
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*
 30
 <400> 28
 cuugcuagcc auauauuuu u 21
 35
 <210> 29
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 29
 uuucuaagc cauacucgcu 20
 40
 <210> 30
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> *Pan troglodytes*
 45
 <400> 30
 cucgcuagcc auauuuuuc 20
 50
 <210> 31
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 55
 <400> 31
 agccauacu gcuauuuu u 21
 60
 <210> 32
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> *Cavia porcellus*
 <400> 32
 cuugcuagcc auauuuuuc 20
 65

5	<210> 33	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> <i>Suncus murinus</i>	
10	<400> 33	
	cuugcuagcc auauauuuuc	20
	<210> 34	
	<211> 20	
15	<212> ARN	
	<213> <i>Atelerix albiventris</i>	
	<400> 34	
	cucacuagcc auauauuuuu	20
20	<210> 35	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> <i>Canis lupus familiaris</i>	
25	<400> 35	
	uuugcuagcc auauauuuuc	20
	<210> 36	
	<211> 20	
30	<212> ARN	
	<213> <i>Felis catus</i>	
	<400> 36	
	uuugcuagcc auauauuuuc	20
35	<210> 37	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> <i>Equus caballus</i>	
40	<400> 37	
	cuugcuagcc auauauuuuc	20
	<210> 38	
	<211> 19	
45	<212> ARN	
	<213> <i>Bos taurus</i>	
	<400> 38	
	cuugcuagcc auauguuuu	19
50	<210> 39	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> <i>Monodelphis domestica</i>	
55	<400> 39	
	ucggauagcc auauauucuc	20
	<210> 40	
	<211> 20	
60	<212> ARN	
	<213> <i>Ornithorhynchus anatinus</i>	
	<400> 40	
	ucugauagcc auauauuauuc	20
65		

5	<210> 41 <211> 20 <212> ARN <213> <i>Gallus gallus</i>	
	<400> 41 uccaaauagcc auauuuuacu	20
10	<210> 42 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 42 uuauaagcaa gaagccaggc cc	22
15	<210> 43 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Mus musculus</i>	
20	<400> 43 gccacaugaa gccauguuu u	21
25	<210> 44 <211> 20 <212> ARN <213> <i>Rattus norvegicus</i>	
30	<400> 44 gucacaugaa gccauuguuu	20
35	<210> 45 <211> 20 <212> ARN <213> <i>Cavia porcellus</i>	
	<400> 45 agcacuugaa gccauuguau	20
40	<210> 46 <211> 20 <212> ARN <213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
45	<400> 46 aucacuugaa gccauuuuau	20
50	<210> 47 <211> 20 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 47 gucaguugaa gccauuuuau	20
55	<210> 48 <211> 20 <212> ARN <213> <i>Pan troglodytes</i>	
60	<400> 48 gucacuugaa gccauuuuau	20

	<210> 49	
	<211> 19	
	<212> ARN	
5	<213> <i>Macaca mulatta</i>	
	<400> 49	
	gucacuugaa gccauuuau	19
10	<210> 50	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> <i>Atelerix albiventris</i>	
15	<400> 50	
	auuacuugaa gccauuuuau	20
	<210> 51	
	<211> 19	
	<212> ARN	
20	<213> <i>Canis lupus familiaris</i>	
	<400> 51	
	aucacugagc cauuuuuac	19
25	<210> 52	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> <i>Felis catus</i>	
30	<400> 52	
	uauacacugaa gccauuuuau	20
	<210> 53	
	<211> 19	
	<212> ARN	
35	<213> <i>Equus caballus</i>	
	<400> 53	
	ucacuugaag ccuuuuuau	19
40	<210> 54	
	<211> 18	
	<212> ARN	
	<213> <i>Loxodonta africana</i>	
45	<400> 54	
	aucacugaag ccuuuuua	18
	<210> 55	
	<211> 23	
	<212> ARN	
50	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 55	
55	uggaaagccc ugccuugcug cuu	23
	<210> 56	
	<211> 22	
	<212> ARN	
60	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 56	
	guguuuggua auacacgacg au	22

ES 2 632 212 T3

5	<210> 57 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Mus musculus</i> <400> 57 acauuuggua cuacacgacg au 22	
10	<210> 58 <211> 90 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 58	
15	aggccucgcu guucucuaug gcuuuuuuuu ccuaugugau ucuacugcuc acucauuuag ggauuggagc cguggcgcac ggcggggaca	60 90
20	<210> 59 <211> 100 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 59	
25	agauaaaauuc acucuagugc uuuauuggcuu uuuauuccua ugugauagua auaaagucuc auguagggau ggaagccaug aaauacauug ugaaaaauca	60 100
30	<210> 60 <211> 97 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 60	
35	cacucugcug uggccuaugg cuuuucauuc cuaugugauu gcugucccaa acucauguag ggcuaaaagc caugggcuac agugaggggc gagcucc	60 97
40	<210> 61 <211> 23 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 61 uauugcuuuu uauuccuauug uga 23	
45	<210> 62 <211> 23 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 62	
50	uauugcuuuu cauuccuauug uga 23	
55	<210> 63 <211> 94 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 632 212 T3

	<400> 63	
	uguuuugagc gggggucaag agcaauaacg aaaauguuu gucauaaacg guuuuucauu	60
	auugcuccug accuccucuc auuugcuaua uuca	94
5	<210> 64 <211> 23 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 64 ucaagagcaa uaacgaaaaa ugu 23	
15	<210> 65 <211> 77 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 65	
	guggccucgu ucaaguaauc caggauaggc ugugcagguc ccaaugggcc uauucuuggu	60
20	uacuugcacg gggacgc	77
25	<210> 66 <211> 84 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 66	
	ggcuguggcgu ggauucaagu aauccaggau aggcuguuuc caucugugag gccuauucuu	60
30	gauuacuugu uucuggaggc agcu	84
35	<210> 67 <211> 77 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 67	
	ccgggaccca guucaaguaa uucaggauag guugugugcu guccagccug uucuccauua	60
40	cuuggcucgg ggaccgg	77
45	<210> 68 <211> 22 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 68 uucaaguaau ccaggauagg cu 22	
	<210> 69 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 69 uucaaguaau ucaggauagg u 21	

ES 2 632 212 T3

5	<210> 70		
	<211> 110		
	<212> ARN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 70		
	gagcugcuug ccucccccccg uuuuuggcaa ugguagaacu cacacuggug agguaacagg	60	
	auccgguggu ucuagacuug ccaacuauug ggcgaggacu cagccggcac	110	
10	<210> 71		
	<211> 25		
	<212> ARN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
15	<400> 71		
	uuuggcaug guagaacua caccg25		
	<210> 72		
	<211> 82		
20	<212> ARN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 72		
	gcaguccucu guuaguuuug cauaguugca cuacaagaag aauguaguug ugcaaaucua	60	
25	ugcaaaacug augguggccu gc	82	
	<210> 73		
	<211> 87		
	<212> ARN		
30	<213> <i>Homo sapiens</i>		
	<400> 73		
	cacuguucua ugguuaguuu ugcagguuug cauccagcug ugugauauuc ugcugugcaa	60	
	auccaugcaa aacugacugu gguagug	87	
35	<210> 74		
	<211> 96		
	<212> ARN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
40	<400> 74		
	acauugcuac uuacaauuag uuuugcaggu uugcauuuca gcguauauau guauaugugg	60	
	cugugcaaaau ccaugcaaaa cugauuguga uaaugu	96	
45	<210> 75		
	<211> 23		
	<212> ARN		
	<213> <i>Homo sapiens</i>		
50	<400> 75		
	ugugcaaauc uaugcaaac uga 23		

ES 2 632 212 T3

<210> 76
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 76
 ugugcaaauc caugcaaaac uga 23
 10
 <210> 77
 <211> 83
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 77
 ccuuggagua aaguagcagc acauaauggu uuguggauuu ugaaaaggug caggccauau 60
 ugugcugccu caaaaauaca agg 83
 20
 <210> 78
 <211> 98
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 78
 uugaggccuu aaaguacugu agcagcacau caugguuuac augcuacagu caagaugcga 60
 25
 aucauuuuuu gcugcucuag aaauuuuagg aaauucan 98
 30
 <210> 79
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 79
 uagcagcaca uaaugguuug ug 22
 35
 <210> 80
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <400> 80
 uagcagcaca ucaugguuuu ca 22
 45
 <210> 81
 <211> 78
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 81
 cugaggagca gggcuuagcu gcuugugagc aggguccaca ccaagucgug uucacagugg 60
 50
 cuaaguuccg cccccag 78
 55
 <210> 82
 <211> 97
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

	<400> 82	
	accucucuaa caaggugcag agcuuagcug auuggugaac agugauuggu uuccgcuuug	60
	uucacagugg cuaaguucug caccugaaga gaagggug	97
5	<210> 83 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 83 uucacagugg cuaaguuccg c 21	
	<210> 84 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
15		
	<400> 84 uucacagugg cuaaguucug c 21	
20		
	<210> 85 <211> 110 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 85	
	ugaguuuuga gguugcuuca gugaacauuc aacgcugucg gugaguugg aauaaaauc	60
	aaaaccaucg accguugauu guaccuauug gcuaaccauc aucuacucca	110
30	<210> 86 <211> 110 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<400> 86	
	agaagggcua ucaggccagc cuucagagga cuccaaggaa cauucaacgc ugucggugag	60
	uuugggauuu gaaaaaacca cugaccguug acuguaccuu gggguccua	110
40	<210> 87 <211> 110 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 87	
45		
	ccugugcaga gauuauuuuu uaaaagguca caaucaacau ucauugcugu cgguggguug	60
	aacugugugg acaagcucac ugaacauga augcaacugu ggccccgcuu	110
50	<210> 88 <211> 89 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	

ES 2 632 212 T3

<400> 88

cugauggcug cacucaacau ucauugcugu cgguggguuu gagucugaau caacucacug 60
aucaaugaa gcaaacugcg gaccaaaca 89

5 <210> 89
<211> 110
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 89

cggaaaauu gccaaaggguu ugagggaaca uucaaccugu cggugaguuu gggcagcuca 60
ggcaaaccu cgaccguuga guggaccug aggccuggaa uugccauccu 110

15 <210> 90
<211> 137
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 90

gucccccucc cuaggccaca gccgaggua caaucaacau ucauuguugu cgguggguug 60
ugaggacuga ggccagaccc accgggggau gaauucacu guggcugggc cagacacggc 120
uuaaggggaa ugaggac 137

25 <210> 91
<211> 23
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 91
aacaaucaac gcugcggug agu 23

35 <210> 92
<211> 23
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 92
aacaaucau gcugcggug ggu 23

45 <210> 93
<211> 22
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 93
aacaaucaac cugcgguga gu 22

55 <210> 94
<211> 23
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

60 <400> 94
aacaaucau guugcggug ggu 23

	<210> 95	
	<211> 25	
	<212> ARN	
5	<213> <i>Mus musculus</i>	
	<400> 95 25	
	ugaccaccug cugcugcggg ggggu	25
10	<210> 96	
	<211> 26	
	<212> ARN	
	<213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>	
15	<400> 96	
	cagccacccu gcugcugccc aguggg	26
20	<210> 97	
	<211> 26	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 97	
	cagccccccu gcugcugccc ggaggg	26
25	<210> 98	
	<211> 26	
	<212> ARN	
	<213> <i>Pan troglodytes</i>	
30	<400> 98	
	cagccccccu gcugcugccc ggaggg	26
35	<210> 99	
	<211> 26	
	<212> ARN	
	<213> <i>Macaca mulatta</i>	
40	<400> 99	
	cagccccccu gcugcugccc agaggg	26
45	<210> 100	
	<211> 26	
	<212> ARN	
	<213> <i>Otolemur garnettii</i>	
	<400> 100	
	cagccacccu gcugcugccc agugag	26
50	<210> 101	
	<211> 26	
	<212> ARN	
	<213> <i>Atelerix albiventris</i>	
55	<400> 101	
	ccaccacccu gcugcugccc agagcu	26
60	<210> 102	
	<211> 26	
	<212> ARN	
	<213> <i>Canis lupus familiaris</i>	
	<400> 102	
	cagccacccu gcugcugccc agcgug	26
65		

5	<210> 103 <211> 26 <212> ARN <213> <i>Equus caballus</i>	
	<400> 103 cagccacccu gcugcugccc agugcu	26
10	<210> 104 <211> 25 <212> ARN <213> <i>Bos taurus</i>	
15	<400> 104 caccacccug cugcugccca gaggu 25	
20	<210> 105 <211> 25 <212> ARN <213> <i>Dasypus novemcinctus</i>	
	<400> 105 aagcaaccug cugcugccca gcaca 25	
25	<210> 106 <211> 26 <212> ARN <213> <i>Loxodonta africana</i>	
30	<400> 106 caaccacccu gcugcugccc agugca	26
35	<210> 107 <211> 25 <212> ARN <213> <i>Echinops telfairi</i>	
40	<400> 107 caucccccug cugcugccca gcaca 25	
45	<210> 108 <211> 25 <212> ARN <213> <i>Monodelphis domestica</i>	
50	<400> 108 uagcccccug cugcuaccca uugcc 25	
	<210> 109 <211> 26 <212> ARN <213> <i>Gallus gallus</i>	
55	<400> 109 ccagcccagu gcugcugccg gcugcg	26
60	<210> 110 <211> 143 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR135	

ES 2 632 212 T3

	<400> 110	
	gacggcgcta ggatcatcaa ctcacatagg aatgatctaa aagccataca agtattctgg	60
	tcacagaata caactcacat aggaatgatc taaaagccat acaagatgat cctagcgccg	120
	tcttttttga attcgcggcc cta	143
5	<210> 111 <211> 105 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR135	
	<400> 111	
	tcacatagga atgaaaagcc atacgattca cataggaatg aaaagccata accggtcaca	60
15	taggaatgaa aagccatata actcacatag gaatgaaaag ccata	105
	<210> 112 <211> 100 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR135 – construcción antisentido (directa)	
25	<400> 112	
	tcacatagga agcaaagcca taatcgtcac ataggaagca aagccataat cgtcacatag	60
	gaagcaaagc cataatcgtc acataggaag caaagccata	100
30	<210> 113 <211> 100 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR135 - construcción antisentido (inversa)	
	<400> 113	
	tatggctttg cttcctatgt gacgattatg gctttgcttc ctatgtgacg attatggctt	60
	tgcttcctat gtgacgatta tggctttgct tcctatgtga	100
40	<210> 114 <211> 143 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR335 5p	

ES 2 632 212 T3

<400> 114	
	gacggcgcta ggatcatcaa cacatctttc gttaatcttt gctcttgaca agtattctgg 60
	tcacagaata caacacattt ttctgtaatc ttctgctcttg acaagatgat cctagcgccg 120
	tcttttttga attcgcggcc cta 143
5	<210> 115 <211> 105 <212> ADN <213> Secuencia artificial
10	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR335 5p
<400> 115	
	acatcttttcg ttattgctct tgacgatata ttttctgta ttgctcttga accggacatt 60
15	ttctgtaatt gctcttgatc acacatcttt cgttattgct ctgta 105
20	<210> 116 <211> 100 <212> ADN <213> Secuencia artificial
	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR335-5p - construcción antisentido (directa)
25	<400> 116
	acatcttttcg agctgctctt gaatcgacat tttctgagct gctcttgaat cgacatctttt 60
	cgagctgctc ttgaatcgac atctttctgag ctgctcttga 100
30	<210> 117 <211> 100 <212> ADN <213> Secuencia artificial
35	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR335-5p - construcción antisentido (inversa)
<400> 117	
	tcaagagcag ctcgaaaaat gtcgattcaa gagcagctcg aaaaatgtcg attcaagagc 60
40	agctcgaaaa atgtcgattc aagagcagct cgaaaaatgt 100
45	<210> 118 <211> 141 <212> ADN <213> Secuencia artificial
	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR15a

ES 2 632 212 T3

	<400> 118	
	gacggcgcta ggatcatcaa ccacaaacca ttaatcttgt gctgctacaa gtattctggt	60
	cacagaatac aaccacaaac cattaatctt gtgctgctac aagatgatcc tagecgccgc	120
	ttttttgaat tcgcggccct a	141
5	<210> 119 <211> 101 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR15a	
	<400> 119	
	cacaaacat tatgtgctgc tacgatcaca aaccattatg tgctgctaac cggcacaac	60
	cattatgtgc tgctatcacc acaaacatt atgtgctgct a	101
15		
	<210> 120 <211> 96 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR15a - construcción antisentido (directa)	
25	<400> 120	
	cacaaacaa gcgtgctgct aatcgacaaa accaagcgtg ctgctaatac cacaaccaa	60
	gcgtgctgct aatcgacaaa accaagcgtg ctgcta	96
30	<210> 121 <211> 96 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR15a - construcción antisentido (inversa)	
	<400> 121	
	tagcagcacg cttggtttgt gcgattagca gcacgcttgg tttgtgcat tagcagcacg	60
	cttgggtttgt gcgattagca gcacgcttgg tttgtg	96
40		
	<210> 122 <211> 143 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR19	

ES 2 632 212 T3

	<400> 122		
	gacggcgcta ggatcatcaa ctacagttttg catgatctga tttgcacaca agtattctgg	60	
	tcacagaata caactcagtt ttgcatgac tgatttgcac acaagatgat cctagcgccg	120	
	tcttttttga attcgcgcc cta	143	
5	<210> 123 <211> 105 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR19		
	<400> 123		
	tcagttttgc atggatttgc acacgattca gttttgcatg gatttgcaca accggtcagt	60	
	tttgcattgga tttgcacatc actcagtttt gcatggattt gcaca	105	
15			
	<210> 124 <211> 100 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR19 - construcción antisentido (directa)		
25	<400> 124		
	tcagttttgc atgatttgc caatcgtcag ttttgcattga tttgcacaat cgtcagtttt	60	
	gcatgatttg cacaatcgtc agttttgcat gatttgcaca	100	
30	<210> 125 <211> 97 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
35	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR19 - construcción antisentido (directa)		
	<400> 125		
	tgtgcaaact atgcaaaact gacgattgtg caaatcatgc aaaactgcga ttgtgcaaact	60	
	catgcaaaac tgcgattgtg caaatcatgc aaaactg	97	
40			
	<210> 126 <211> 141 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
45	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR26		

ES 2 632 212 T3

	<400> 126	
	gacggcgcta ggatcatcaa cagcctatcc tggatctatt acttgaacaa gtattctggt	60
	cacagaatac aacagcctat cctggatcta ttacttgaac aagatgatcc tagcgccgtc	120
	ttttttgaat tcgcggccct a	141
5	<210> 127 <211> 101 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR26	
	<400> 127	
	agcctatcct ggattacttg aacgatagcc tatcctggat tacttgaaac cggagcctat	60
15	cctggattac ttgaatcaca gcctatcctg gattacttga a	101
20	<210> 128 <211> 96 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR26 - construcción antisentido (directa)	
25	<400> 128	
	agcctatcct ggttacttga aatcgagcct atcctgggta cttgaaatcg agcctatcct	60
	ggttacttga aatcgagcct atcctgggta cttgaa	96
30	<210> 129 <211> 96 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR26 - construcción antisentido (inversa)	
	<400> 129	
	ttcaagtaac caggataggc tcgatttcaa gtaaccagga taggctcgat ttcaagtaac	60
40	caggataggc tcgatttcaa gtaaccagga taggct	96
45	<210> 130 <211> 140 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR27	

ES 2 632 212 T3

	<400> 130		
	gacggcgcta ggatcatcaa ctgctcacia gcaatctgct aagccctcaa gtattctggt	60	
	cacagaatac aactgctcac aagcaatctg ctaagcccta agatgacct agcgccgtct	120	
	tttttgaatt cggggcccta	140	
5	<210> 131 <211> 101 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR27		
	<400> 131		
	tgctcacaag cagctaagcc ctcgattgct cacaagcagc taagccctac cgggtgctcac	60	
15	aagcagctaa gcccttcact gctcacaagc agctaagccc t	101	
	<210> 132 <211> 92 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR27a - construcción antisentido (directa)		
25	<400> 132		
	gcggaactta gcaactgtgaa atcggcgga cttagcactg tgaaatcggc ggaacttagc	60	
	actgtgaaat cggcggaact tagcactgtg aa	92	
30	<210> 133 <211> 92 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
35	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR27a - construcción antisentido (inversa)		
	<400> 133		
	ttcacagtgc taagttccgc cgatttcaca gtgctaagtt ccgccgattt cacagtgcta	60	
40	agttccgccg atttcacagt gctaagttcc gc	92	
	<210> 134 <211> 141 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
45	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR181		

ES 2 632 212 T3

	<400> 134		
	gacggcgcta ggatcatcaa cactcaccga cagatctgtt gaatgttcaa gtattctggt	60	
	cacagaatac aacactcacc gacagatctg ttgaatgttc aagatgatcc tagcgccgctc	120	
	ttttttgaat tcgcggccct a	141	
5	<210> 135 <211> 101 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR181		
	<400> 135		
	actcaccgac aggttgaatg ttcgatactc accgacaggt tgaatgttac cggactcacc	60	
15	gacagggtta atgtttcaca ctcaccgaca ggttgaatgt t	101	
	<210> 136 <211> 100 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR181d - construcción antisentido (directa)		
25	<400> 136		
	accacccgac agcatgaatg ttatcgacc accgacagca tgaatgttat cgacccaccg	60	
	acagcatgaa tgttatcgac ccaccgacag catgaatgtt	100	
30	<210> 137 <211> 102 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
35	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR181d - construcción antisentido (inversa)		
	<400> 137		
	aacattcatg ctgtcgggtg gtcgataaca ttcattgctgt cgggtgggtac gataacattc	60	
40	atgctgtcgg tgggtcgatt aacattcatg ctgtcgggtg gt	102	
	<210> 138 <211> 147 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
45	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR182		

ES 2 632 212 T3

	<400> 138	
	gaogggcgcta ggatcatcaa ccggtgtgag ttctacatct cattgccaaa caagtattct	60
	ggtcacagaa tacaaccggt gtgagttcta catctcattg ccaaacaaga tgatcctagc	120
	gccgtctttt ttgaattcgc ggcccta	147
5	<210> 139 <211> 113 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR182	
	<400> 139	
	cggtgtgagt tctaccattg ccaaacgata ggtgtgagtt ctaccattgc caaaaccggc	60
15	ggtgtgagtt ctaccattgc caaatcaccg gtgtgagttc taccattgcc aaa	113
	<210> 140 <211> 108 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR182 - construcción antisentido (directa)	
25	<400> 140	
	cggtgtgagt tagccattgc caaaatcgcg gtgtgagtta gccattgcc aaatcgcggt	60
	gtgagttagc cattgccaaa atcgcggtgt gagttagcca ttgccaaa	108
30	<210> 141 <211> 108 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencia de desactivación para miR182 - construcción antisentido (inversa)	
35	<400> 141	
	tttggcaatg gctaactcac accgcgattt tggcaatggc taactcacac cgcgattttg	60
	gcaatggcta actcacaccg cgattttggc aatggctaac tcacaccg	108
40	<210> 142 <211> 23 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido anti-miR-135a	
	<400> 142 ucacauagga auaaaaagcc aua	23
50		

5 <210> 143
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido anti-miR-135b

 10 <400> 143
 ucacauagga augaaaagcc aua 23

 15 <210> 144
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido anti-miR-335

 20 <400> 144
 acauuuuucg uuauugcucu uga 23

 25 <210> 145
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido anti-miR-26a

 30 <400> 145
 agccuauccu ggauuacuug aa 22

 35 <210> 146
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido anti-miR-26b

 40 <400> 146
 accuauccug aaauacuuga a 21

 45 <210> 147
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Oligonucleótido anti-miR-182

 55 <400> 147
 cggugugagu ucuaccuug ccaaa 25

 60 <210> 148
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido anti-miR-19a

 65 <400> 148
 ucaguuuugc auagauuugc aca 23

5 <210> 149
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido anti-miR-19b

 10 <400> 149
 ucaguuuugc auggauuugc aca 23

 <210> 150
 <211> 22
 <212> ARN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido anti-miR-15a

 20 <400> 150
 cacaaaccac uaugugcugc ua 22

 <210> 151
 <211> 22
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido anti-miR-15b
 30 <400> 151
 uguaaaccac gaugugcugc ua 22

 <210> 152
 <211> 21
 35 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> Oligonucleótido anti-miR-27a

 <400> 152
 gcggaacuua gccacuguga a 21

 45 <210> 153
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Oligonucleótido anti-miR-27b

 <400> 153
 55 gcagaacuua gccacuguga a 21

 <210> 154
 <211> 23
 <212> ARN
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido anti-miR-181a

 <400> 154
 65 acucaccgac agcguugaau guu 23

5
 <210> 155
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido anti-miR-181b

10
 <400> 155
 acccaccgac agcaaugaau guu 23

15
 <210> 156
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido anti-miR-181c

20
 <400> 156
 acucaccgac agguugaau uu 22

25
 <210> 157
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido anti-miR-181d

30
 <400> 157
 acccaccgac aacaugaau guu 23

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un miR-135, un precursor del mismo, o un polinucleótido exógeno que codifica dicho miR-135 o dicho precursor del mismo, para su uso en el tratamiento de una afección médica en la que un aumento del nivel de serotonina es terapéuticamente beneficioso.
- 10 2. El miR-135 para el uso de la reivindicación 1, en el que dicho polinucleótido exógeno que codifica dicho miR-135 o dicho precursor del mismo está comprendido en una construcción de ácido nucleico, estando dicho polinucleótido bajo un control de la transcripción de un elemento regulador que actúa en *cis*.
- 15 3. Una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un miR-135 o un precursor del mismo, estando dicha secuencia de ácido nucleico bajo un control de la transcripción de un elemento regulador que actúa en *cis* activo en una célula neuroglial.
- 20 4. El miR-135 para el uso de la reivindicación 2, en el que dicho elemento regulador que actúa en *cis* es activo en una célula neuroglial.
- 25 5. El miR-135 para el uso de la reivindicación 1, la construcción de ácido nucleico de la reivindicación 3, en los que dicho miR-135 es como se expone en SEQ ID NO: 58-62.
- 30 6. El miR-135 para el uso de la reivindicación 1, en el que dicho miR-135 comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en una cadena principal modificada, un enlace internucleosídico modificado y una base modificada.
- 35 7. El miR-135 para el uso de la reivindicación 6, en el que dicha cadena principal modificada comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en un fosforotioato, un fosforotioato quiral, un fosforoditioato, un fosfotriéster, un aminoalquilfosfotriéster, un metilfosfonato, un alquilfosfonato, un fosfonato quiral, un fosfinato, un fosforamidato, un aminoalquilfosforamidato, un tionofosforamidato, un tionoalquilfosfonato, un tionoalquilfosfotriéster, un boranofosfato, un fosfodiéster, un ácido peptidonucleico (PNA) y un 2'-O-metoxietilo.
- 40 8. El miR-135 para el uso de la reivindicación 1, en el que dicho miR-135 comprende una modificación tanto en un azúcar como en un enlace internucleosídico.
- 45 9. El miR-135 para el uso de la reivindicación 1, en el que dicha afección médica se selecciona del grupo que consiste en una depresión, una ansiedad, un estrés, una fatiga, una función cognitiva deteriorada, un ataque de pánico, un comportamiento compulsivo, una adicción, una fobia social, un trastorno del sueño, un trastorno relacionado con la alimentación, un trastorno del crecimiento y un trastorno de la reproducción.
- 50 10. El miR-135 para el uso de la reivindicación 1, en el que dicha afección médica es un trastorno del estado de ánimo.
11. Una composición farmacéutica que comprende la construcción de ácido nucleico de la reivindicación 3, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en la que dicho miR-135 es como se expone en SEQ ID NO: 58-62.
13. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en la que dicho miR-135 comprende una modificación tanto en un azúcar como en un enlace internucleosídico.

FIG. 1A

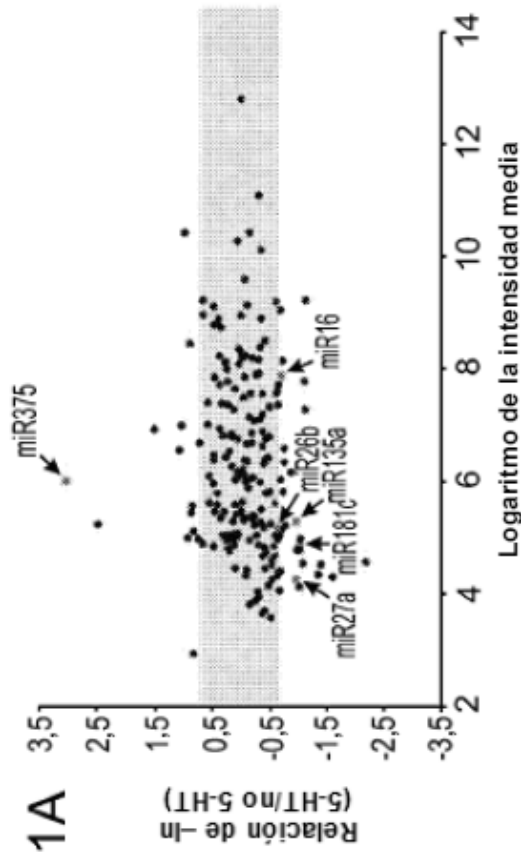


FIG. 1B

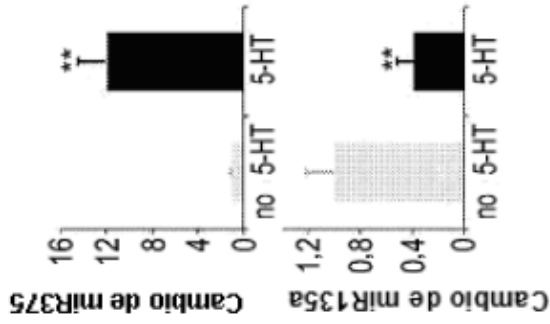


FIG. 1C

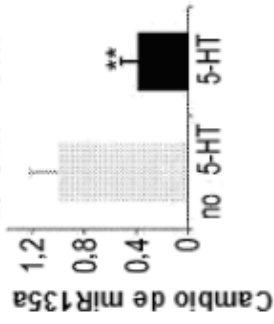


FIG. 1D

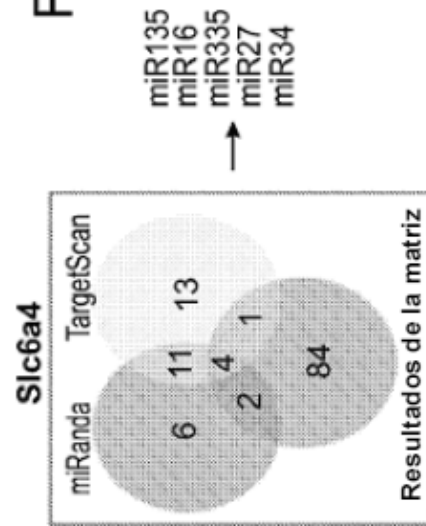


FIG. 1E

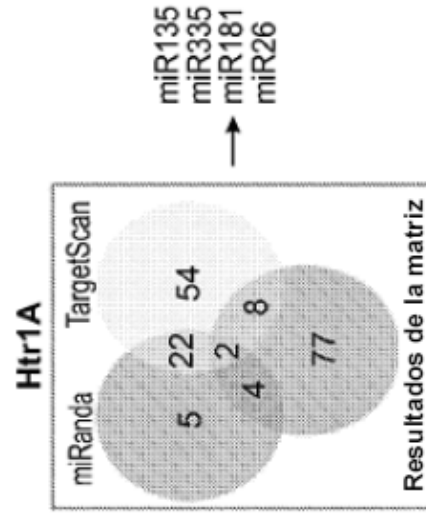


FIG. 1F Tph2

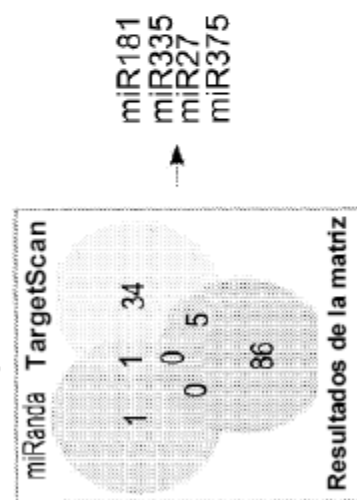


FIG. 1G MaoA

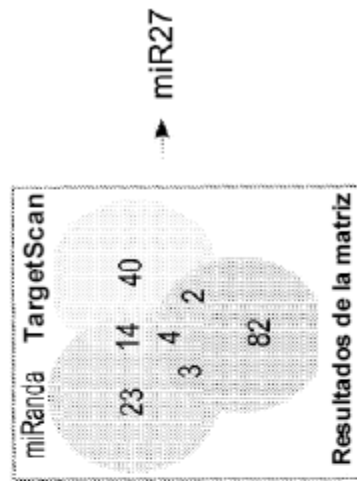


FIG. 1H

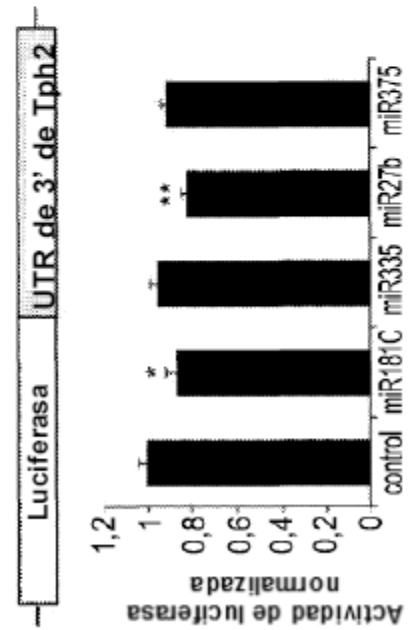


FIG. 1I

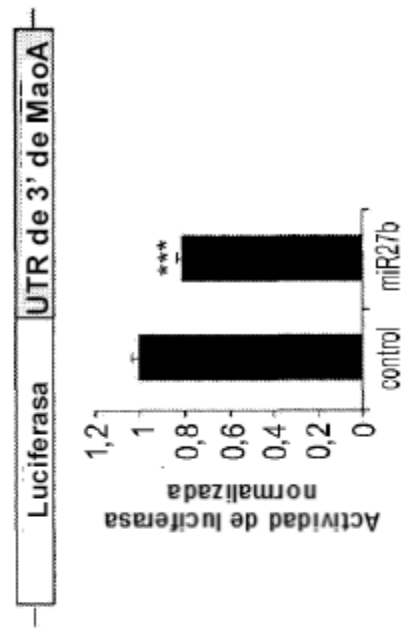


FIG. 2A

3' aguguaucuuuuuUCGGUAu 5'		SEQ ID NO: 24
402 :5' acaggaugucucgcuAGCCAUa 3'	Slc6a4	SEQ ID NO: 25
3' aguguaucuuuacuuuUCGGUAu 5'		SEQ ID NO: 24
402 :5' acaggaugucucgcuAGCCAUa 3'	Slc6a4	SEQ ID NO: 26

FIG. 2C

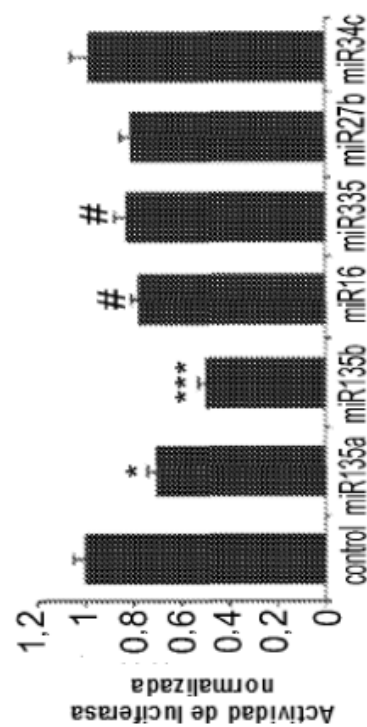


FIG. 2B

3' aguguaucuuUUAUUUUCGGUAu 5'		SEQ ID NO: 24
1865 :5' cuccugccACAUGAAGCCAUu 3'	Htr1a	SEQ ID NO: 27
3' aguguaucuuUACUUUUCGGUAu 5'		SEQ ID NO: 24
1867 :5' gccugccacAUG -AAGCCAUu 3'	Htr1a	SEQ ID NO: 26

FIG. 2D

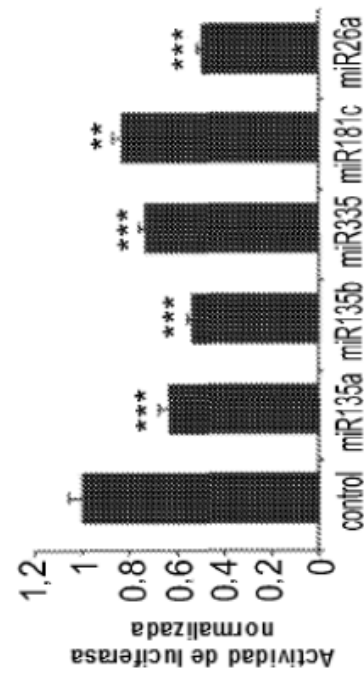


FIG. 2E

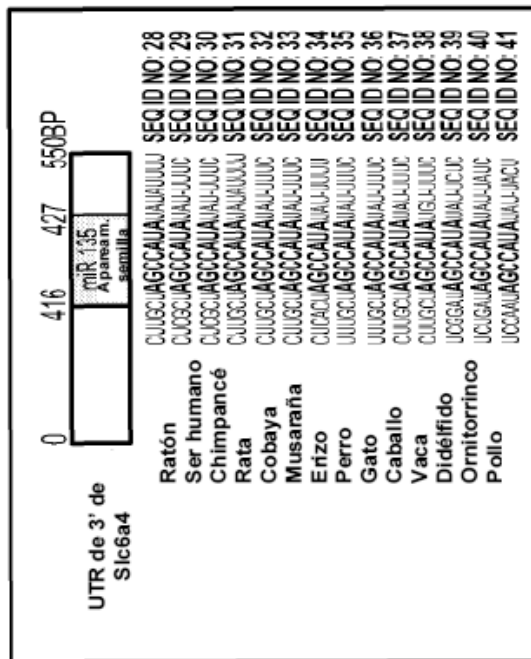


FIG. 2G

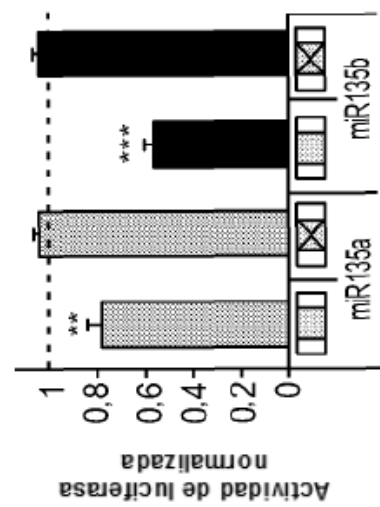


FIG. 2F

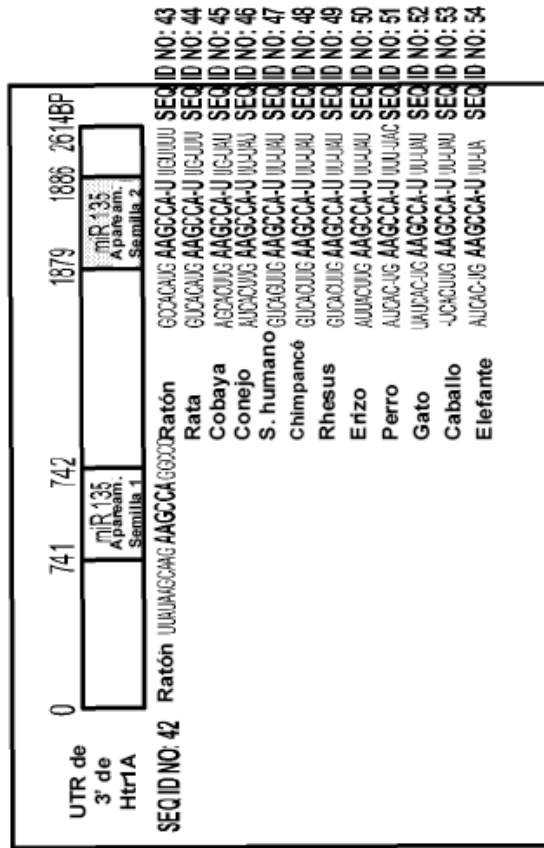


FIG. 2H

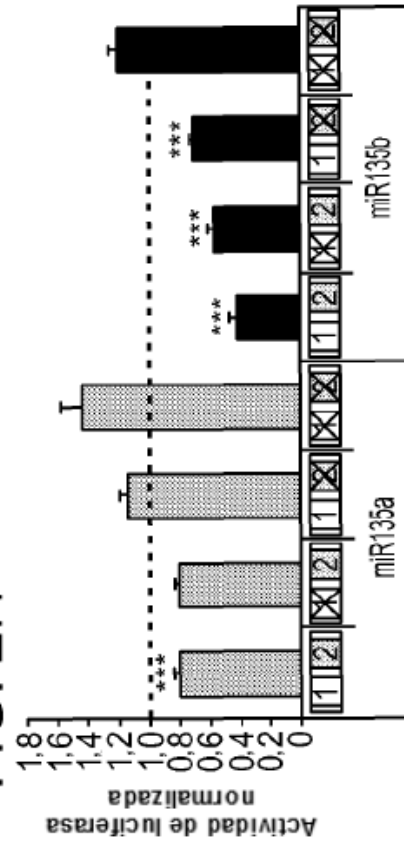


FIG. 3A

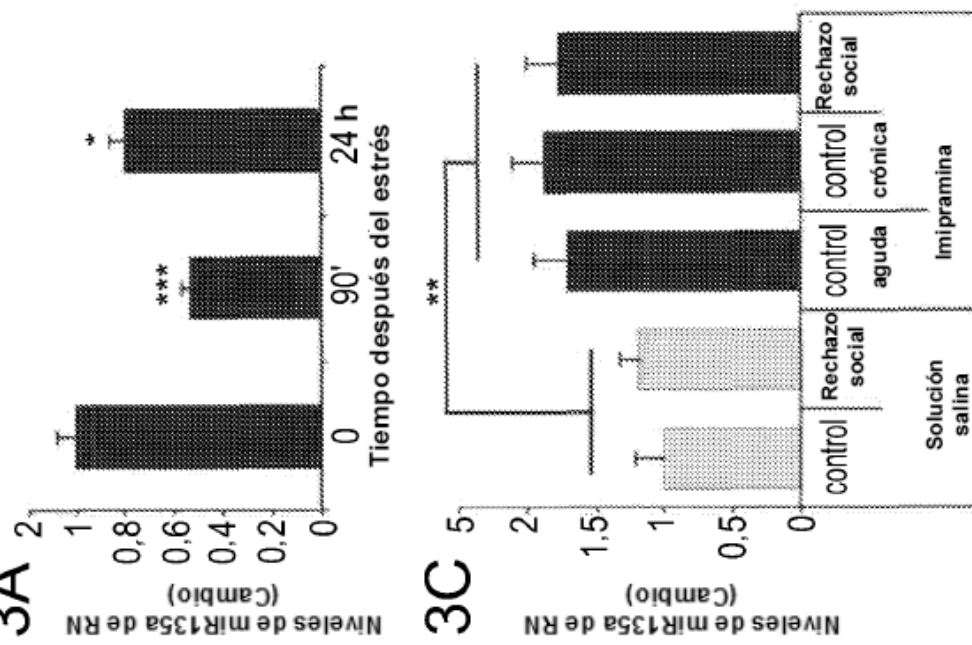


FIG. 3B

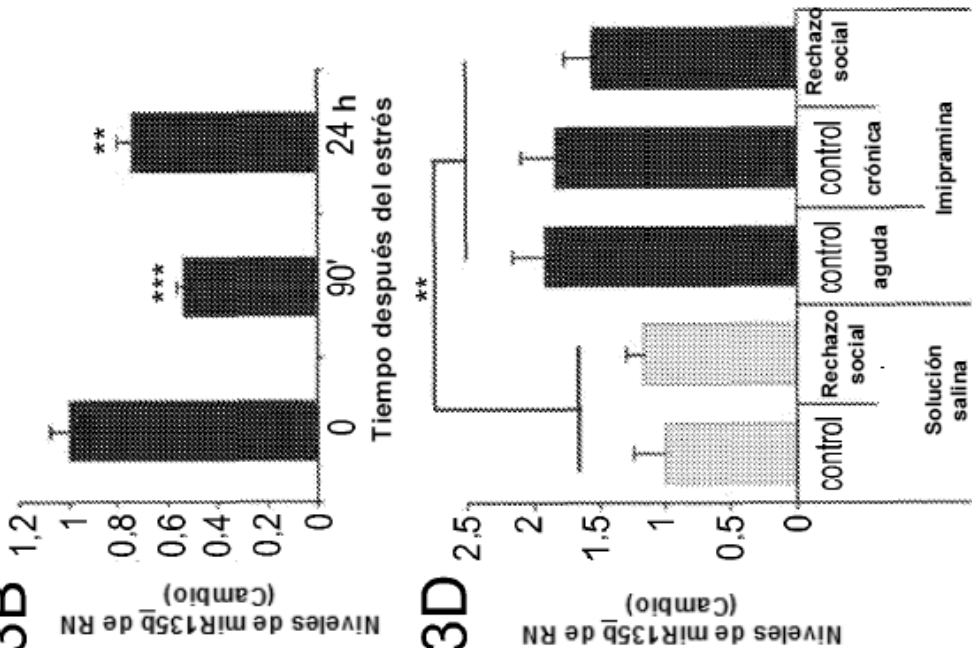


FIG. 3C

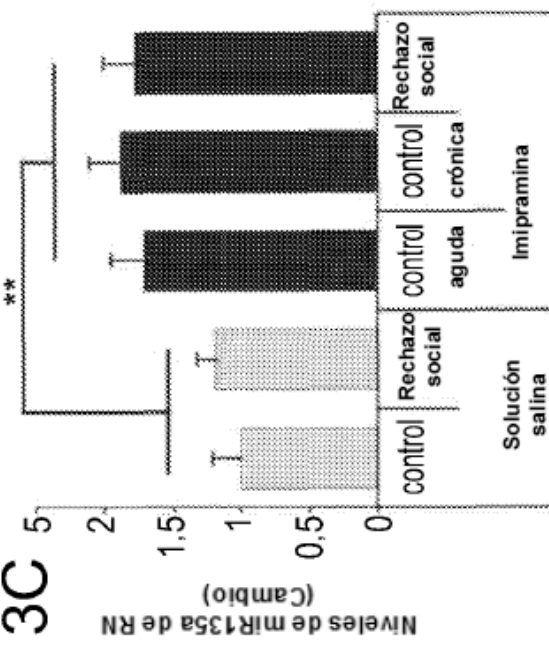


FIG. 3D

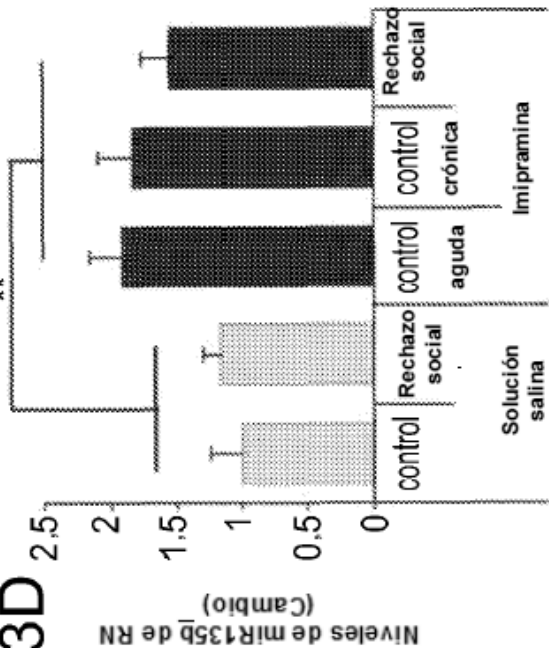


FIG. 3E

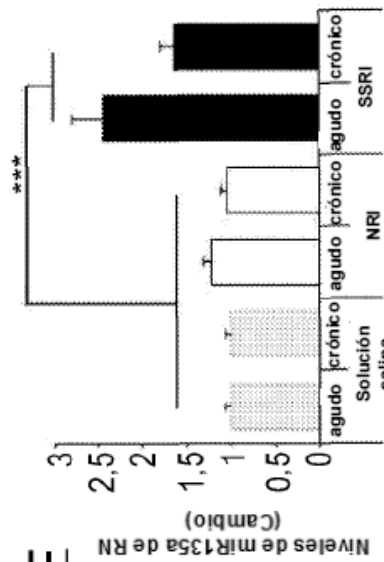


FIG. 3F

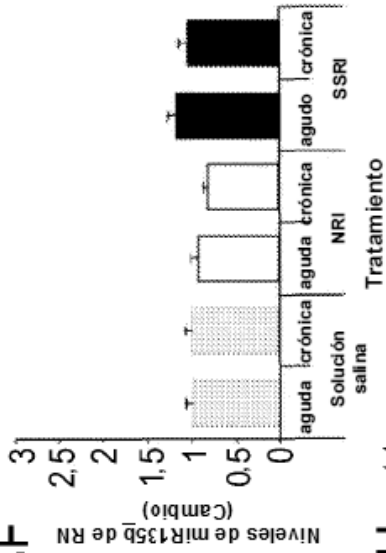


FIG. 3G

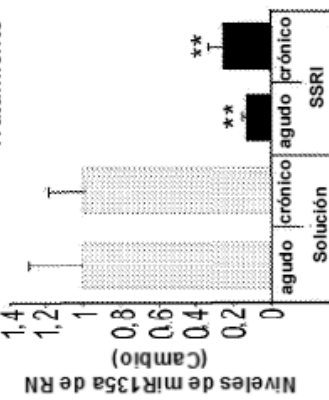


FIG. 3H

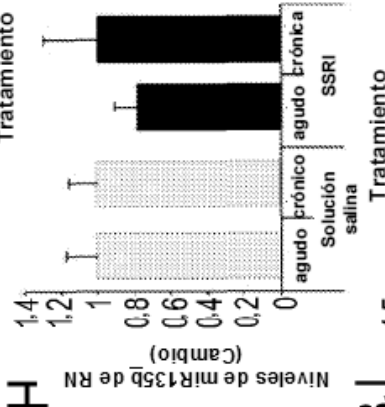


FIG. 3I

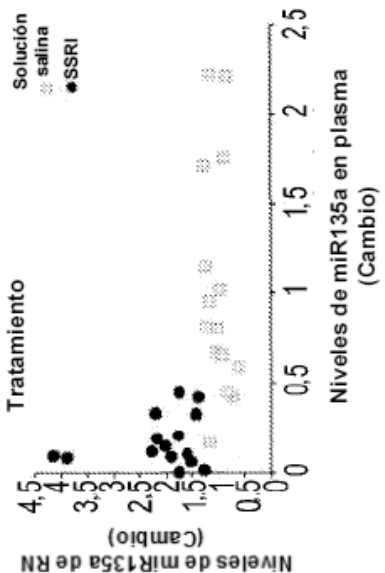


FIG. 3J

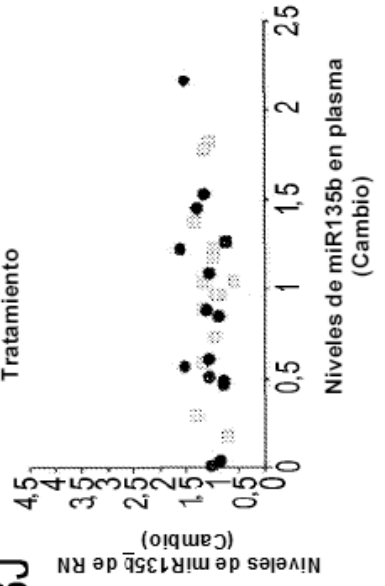


FIG. 4A

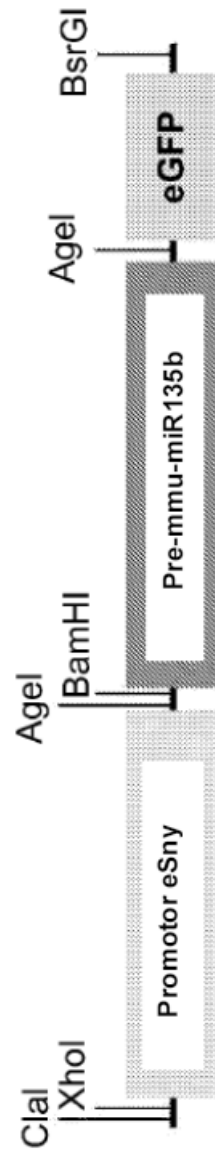


FIG. 4B

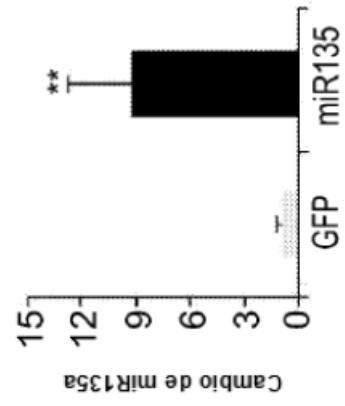


FIG. 4D

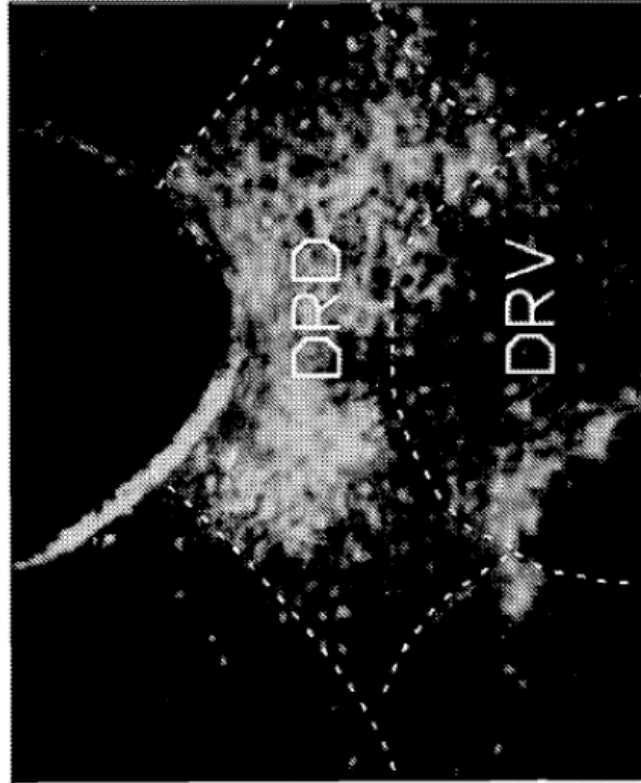


FIG. 4C

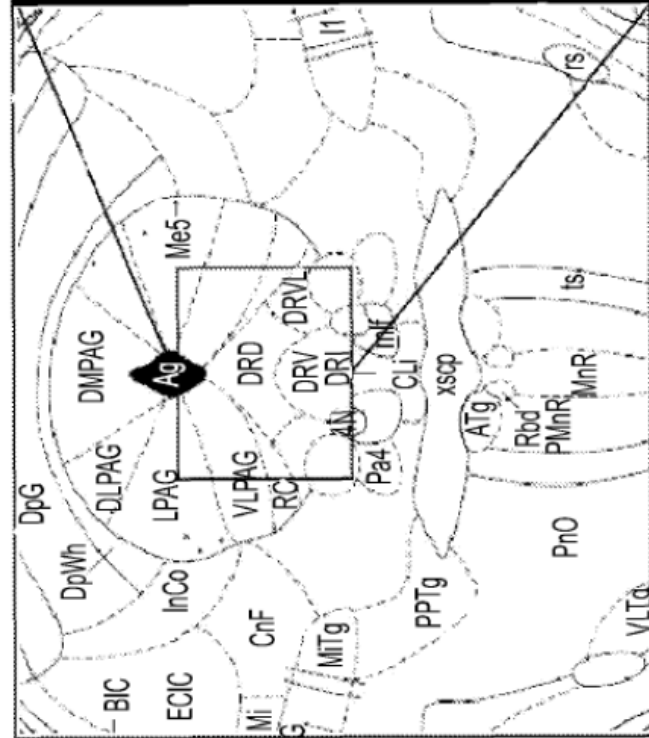


FIG. 4E

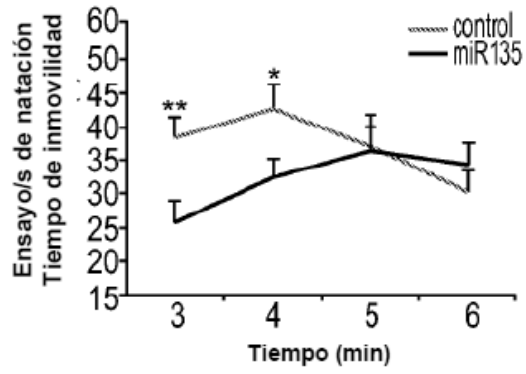


FIG. 4F

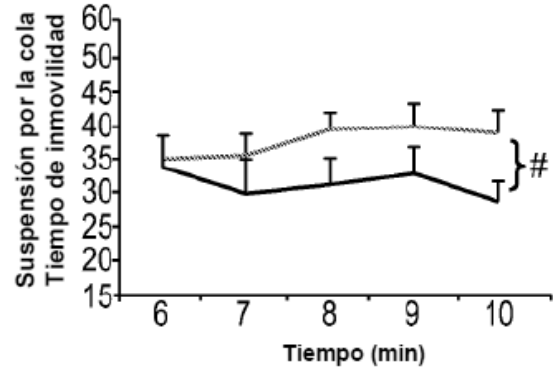


FIG. 4G

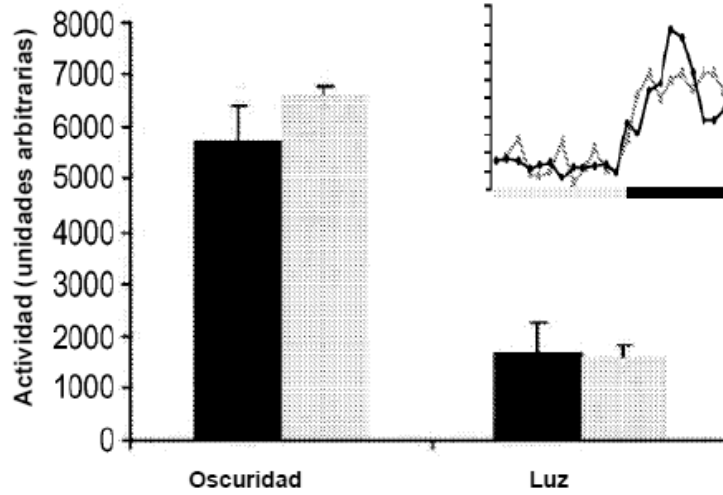


FIG. 4H

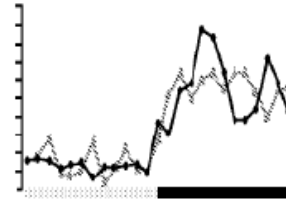
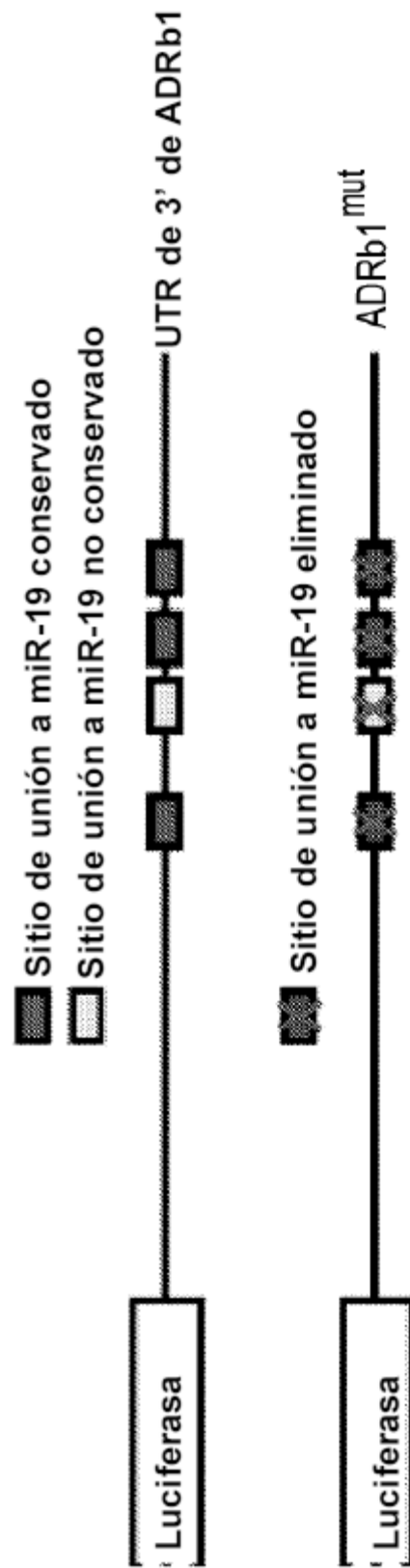


FIG. 5



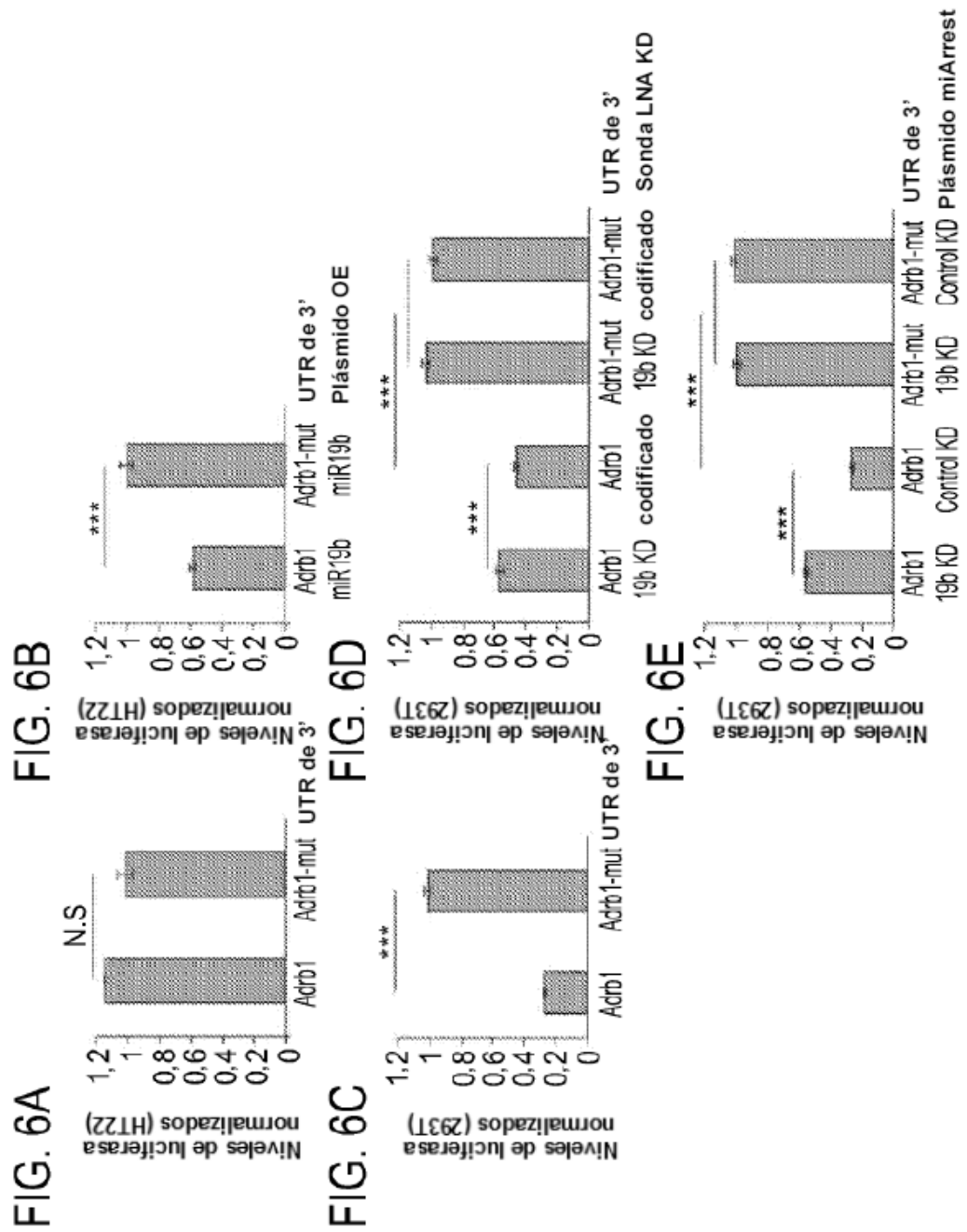


FIG. 7A

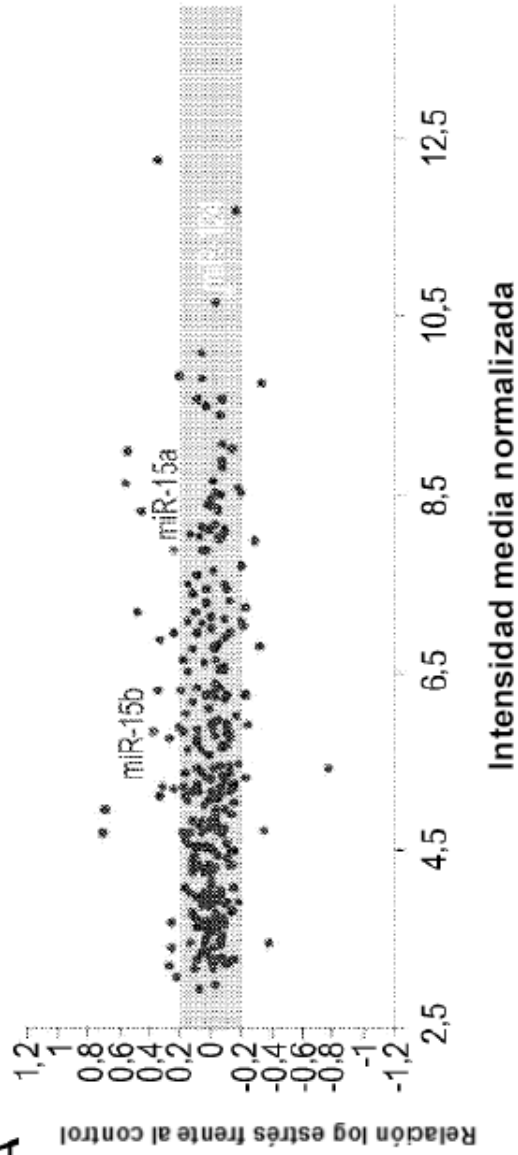


FIG. 7B

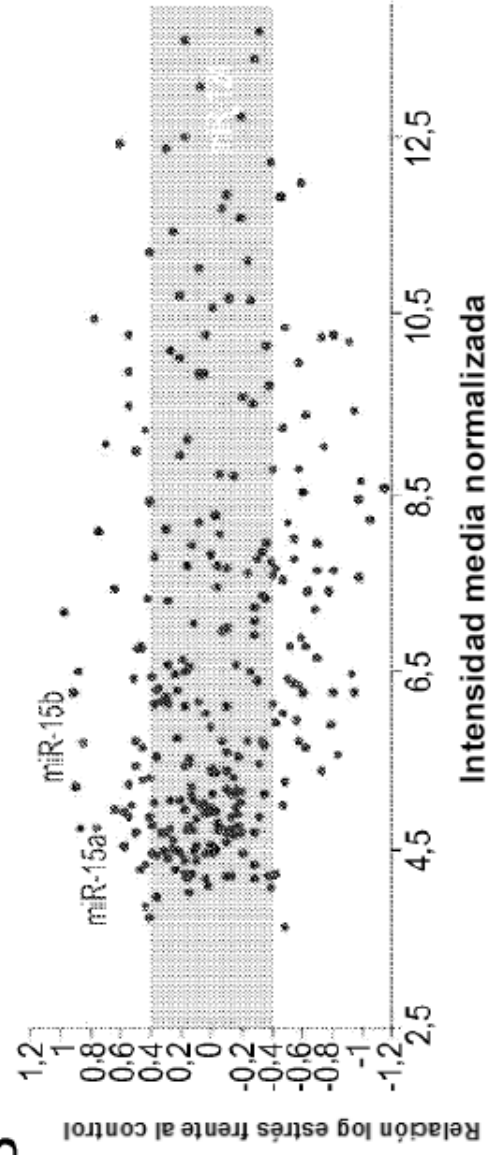


FIG. 7C

Posición 554-560 de UTR de 3' de Crhr1	5'	... UGGAAAGCCCGUGCCUUGCUGCUU ...	SEQ ID NO: 55
mmu-miR-15a	3'	GUGUUUGGUAAUACACGACGAU	SEQ ID NO: 56
Posición 554-560 de UTR de 3' de Crhr1	5'	... UGGAAAGCCCGUGCCUUGCUGCUU ...	SEQ ID NO: 55
mmu-miR-15b	3'	ACAUUUGGUACUACACGACGAU	SEQ ID NO: 57

FIG. 7D

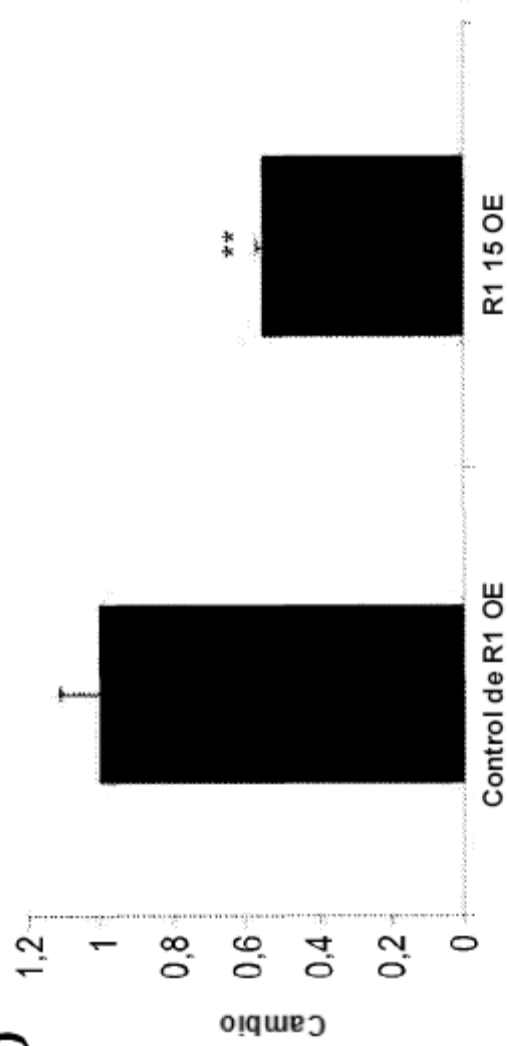


FIG. 8

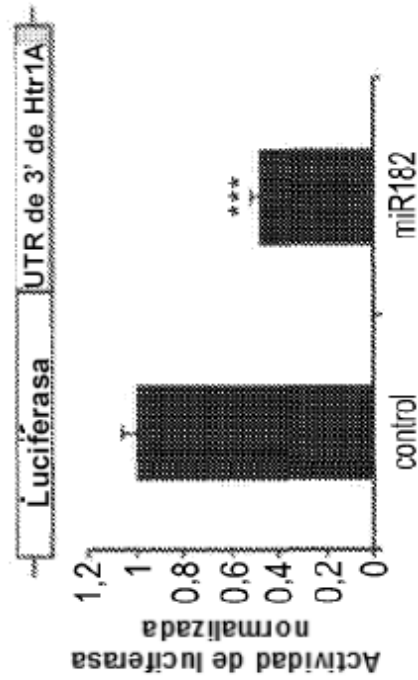


FIG. 9

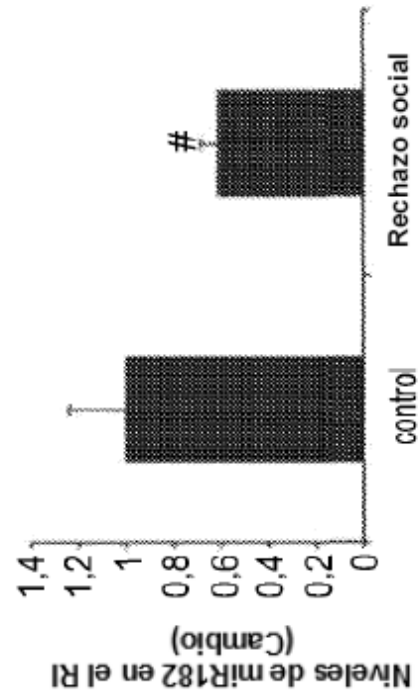
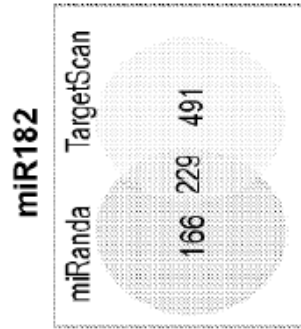


FIG. 10



SLC33A1	familia de transportadores de solutos 33 (transportador de acetil-CoA), miembro 1
FOXP2	forkhead box P2
ADCY2	adenilato ciclasa 2 (cerebro)
ADCY6	adenérgico, alfa-C2-, receptor
BDNF	factor neurotrófico derivado del cerebro
GRIA1	receptor de glutamato, ionotrópico, AMPA 1
GRIA3	receptor de glutamato, ionotrópico, AMPA 3
GRIK3	receptor de glutamato, ionotrópico, kainato 3
GRM5	receptor de glutamato, metabotrópico 5
NUFIP2	proteína de interacción con la proteína de retraso mental de X frágil nuclear 2
CACNB4	subunidad beta 4, dependiente de la tensión, de canal de calcio
SLC1A1	familia de trasp. de solutos 1 (Transp. de glutamato de alta afinidad neuronal/epitelial, sist. Xag), miembro 1
GDNF	factor neurotrófico derivado de la estirpe celular glial
KCNH5	miembro 5, subfamilia H (relacionado con EAG), canal abierto por tensión de potasio
CREB1	proteína de unión a elementos sensibles a cAMP 1
FXR1H	gen de retraso mental de X frágil 1, homólogo autosómico
GAD2	descarboxilasa de ácido glutámico 2
FMRI	homólogo del síndrome de retraso mental de X frágil 1
HTR2C	receptor de 5-hidroxitriptamina (serotonina) 2C
HDAC9	histona desacetilasa 9

FIG. 11A



FIG. 11B

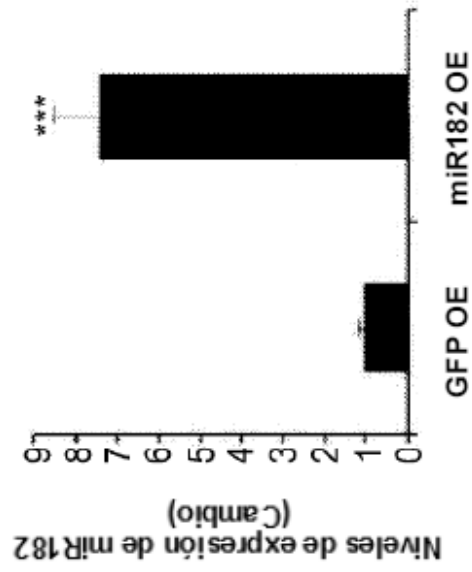


FIG. 11C



FIG. 12A

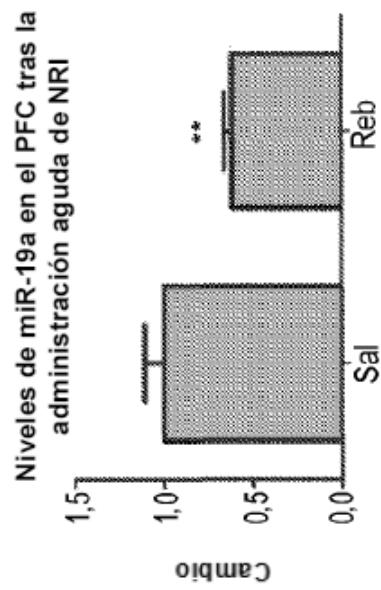


FIG. 12B

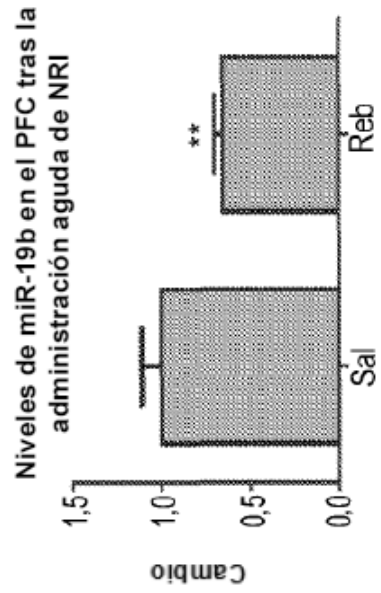


FIG. 12C

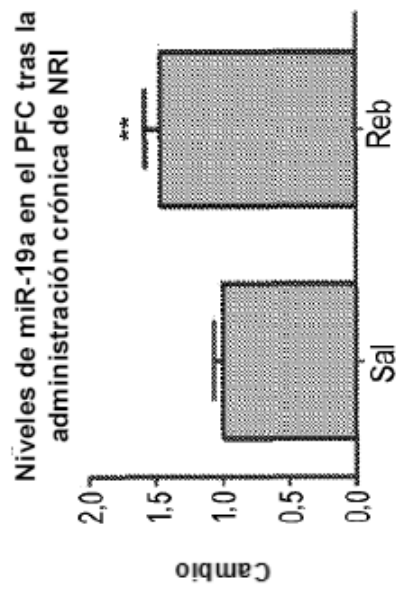


FIG. 12D

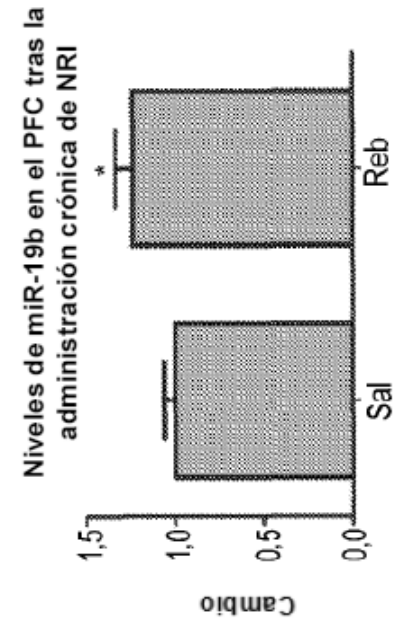


FIG. 13A

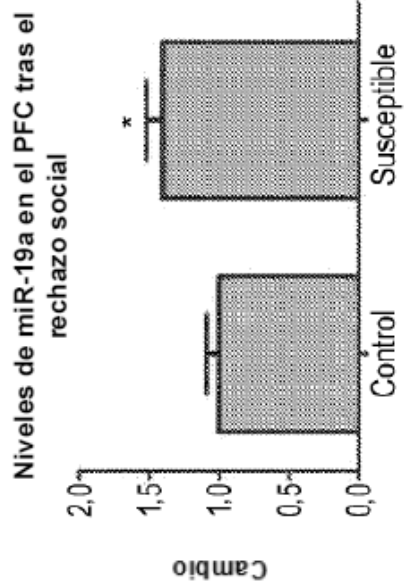


FIG. 13B

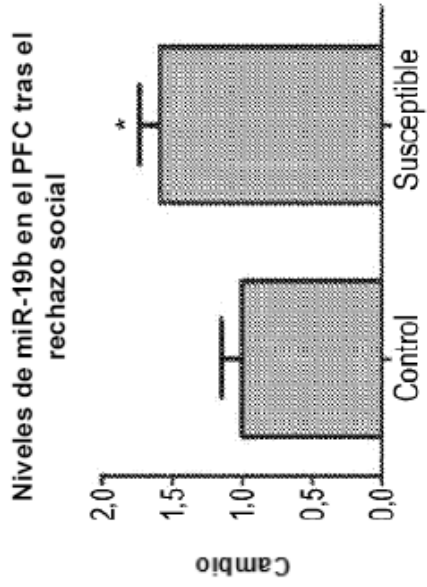


FIG. 13C

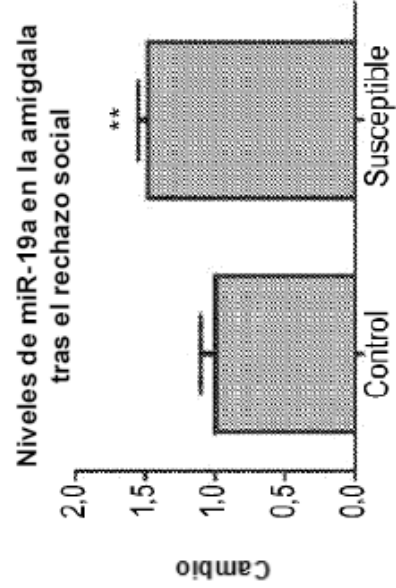


FIG. 13D

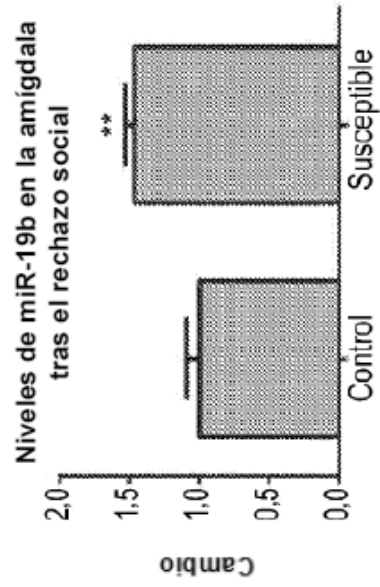
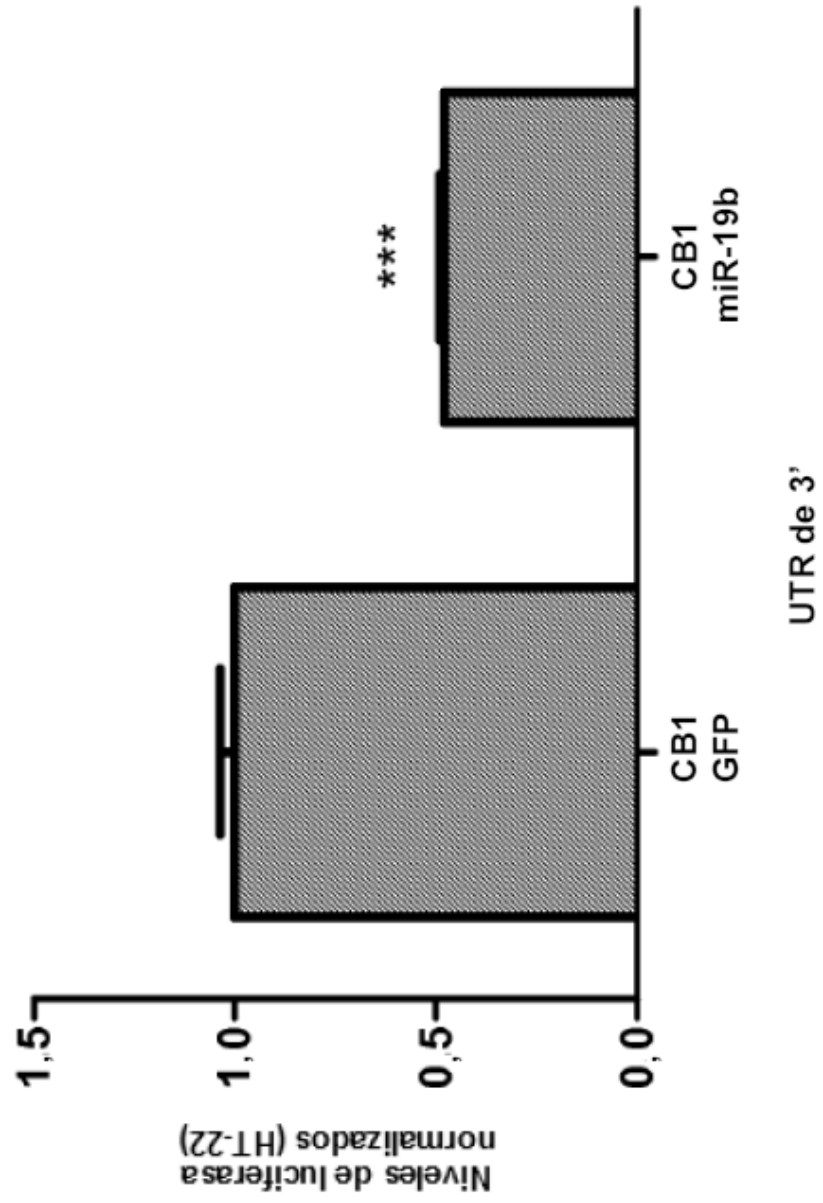


FIG. 14



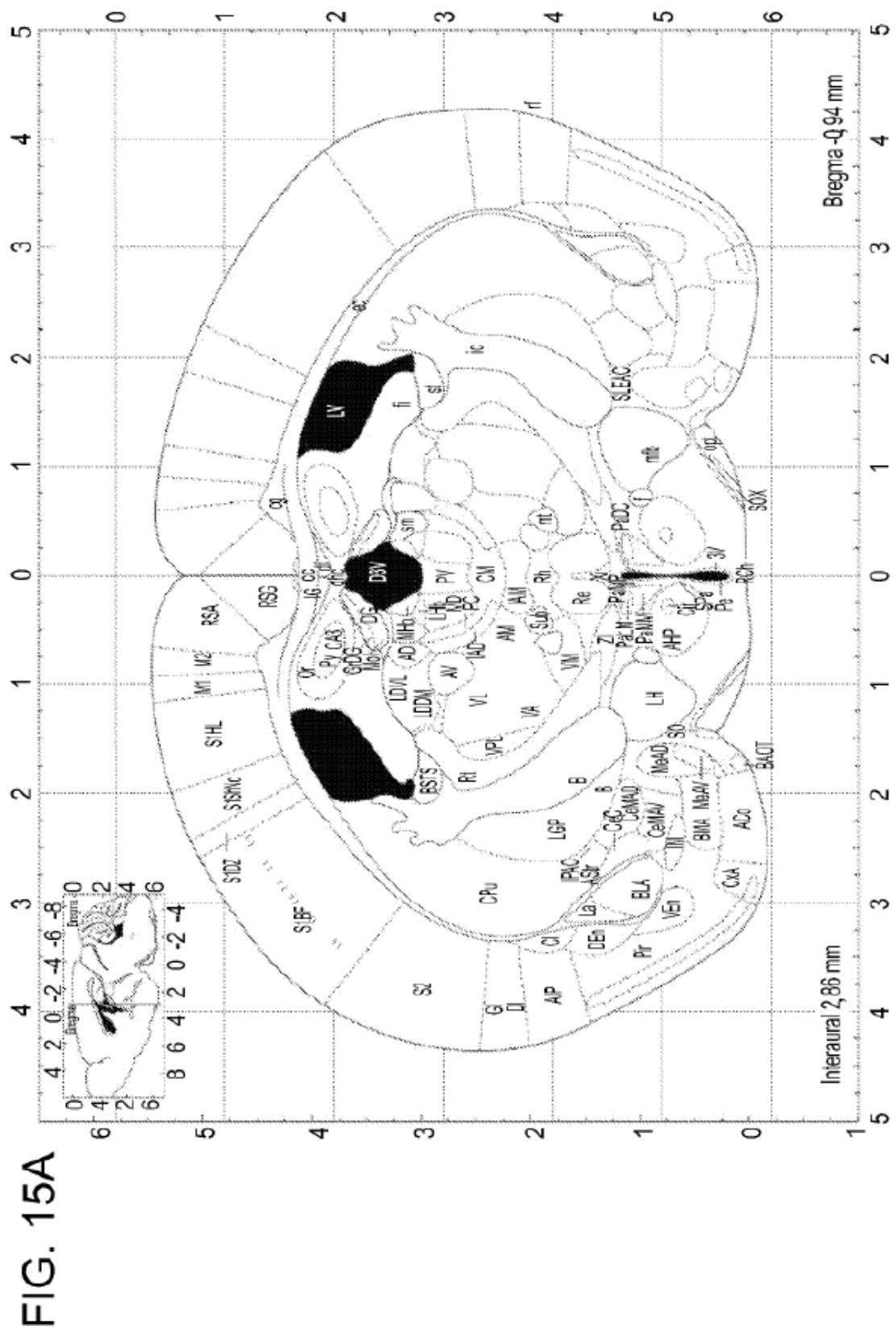


FIG. 15B

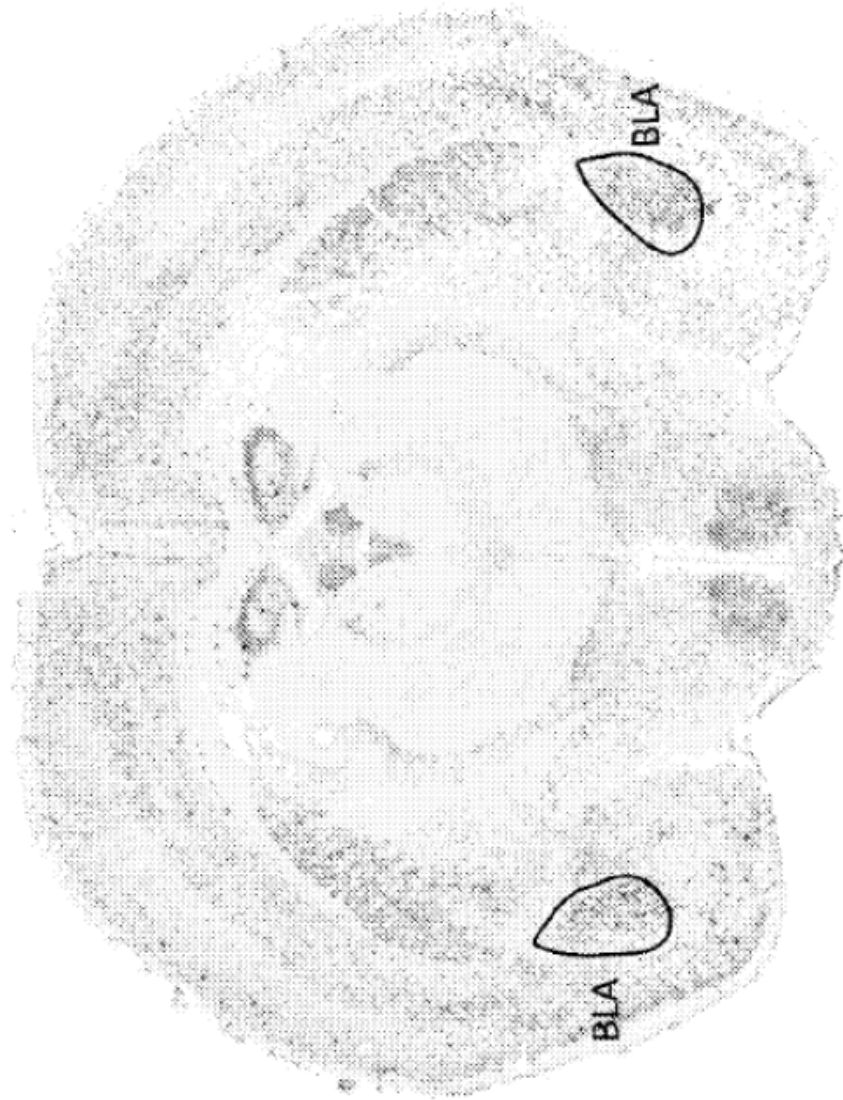


FIG. 16

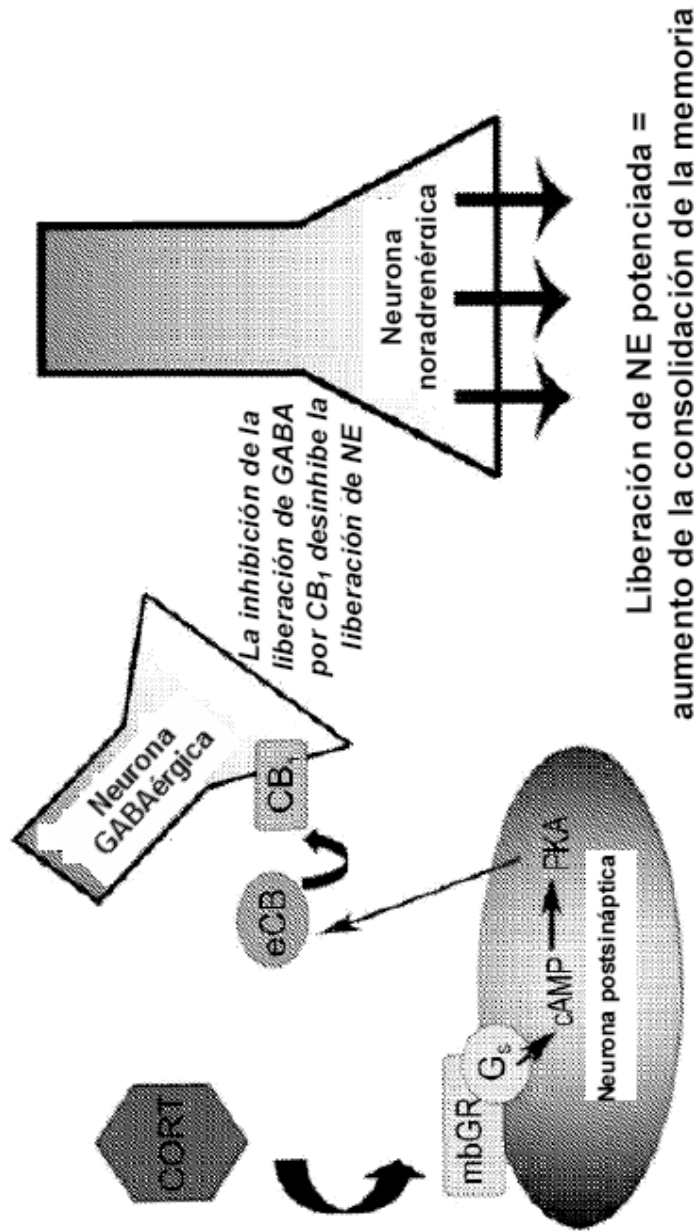


FIG. 17A

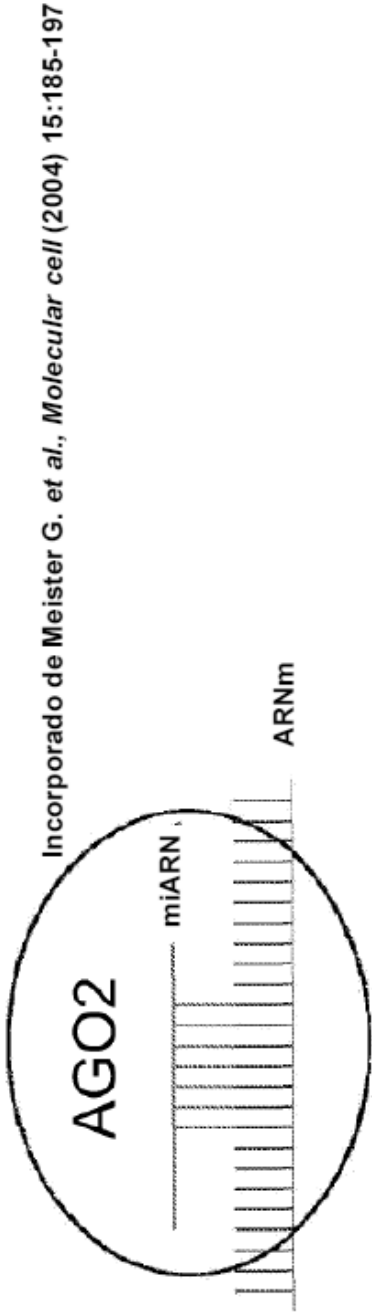


FIG. 17B

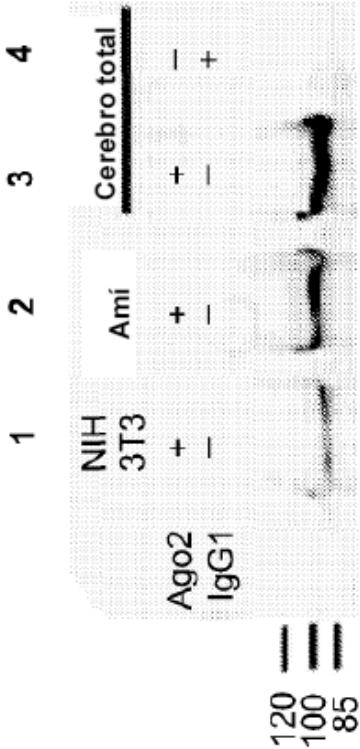
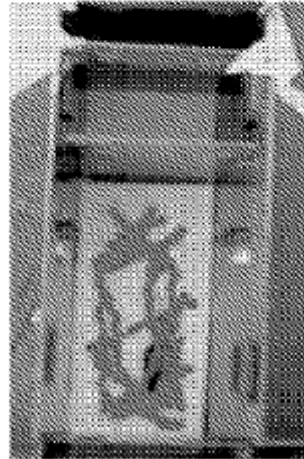
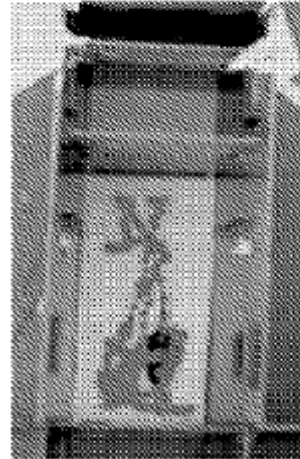


FIG. 18A

Susceptible



Habituación



Ratón no familiar

FIG. 18B

Resiliente

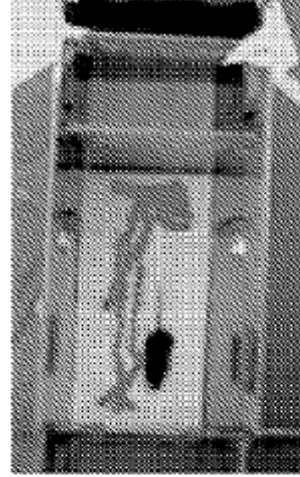
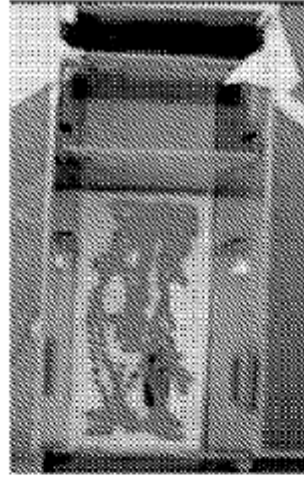


FIG. 18C

FIG. 18D

FIG. 19B

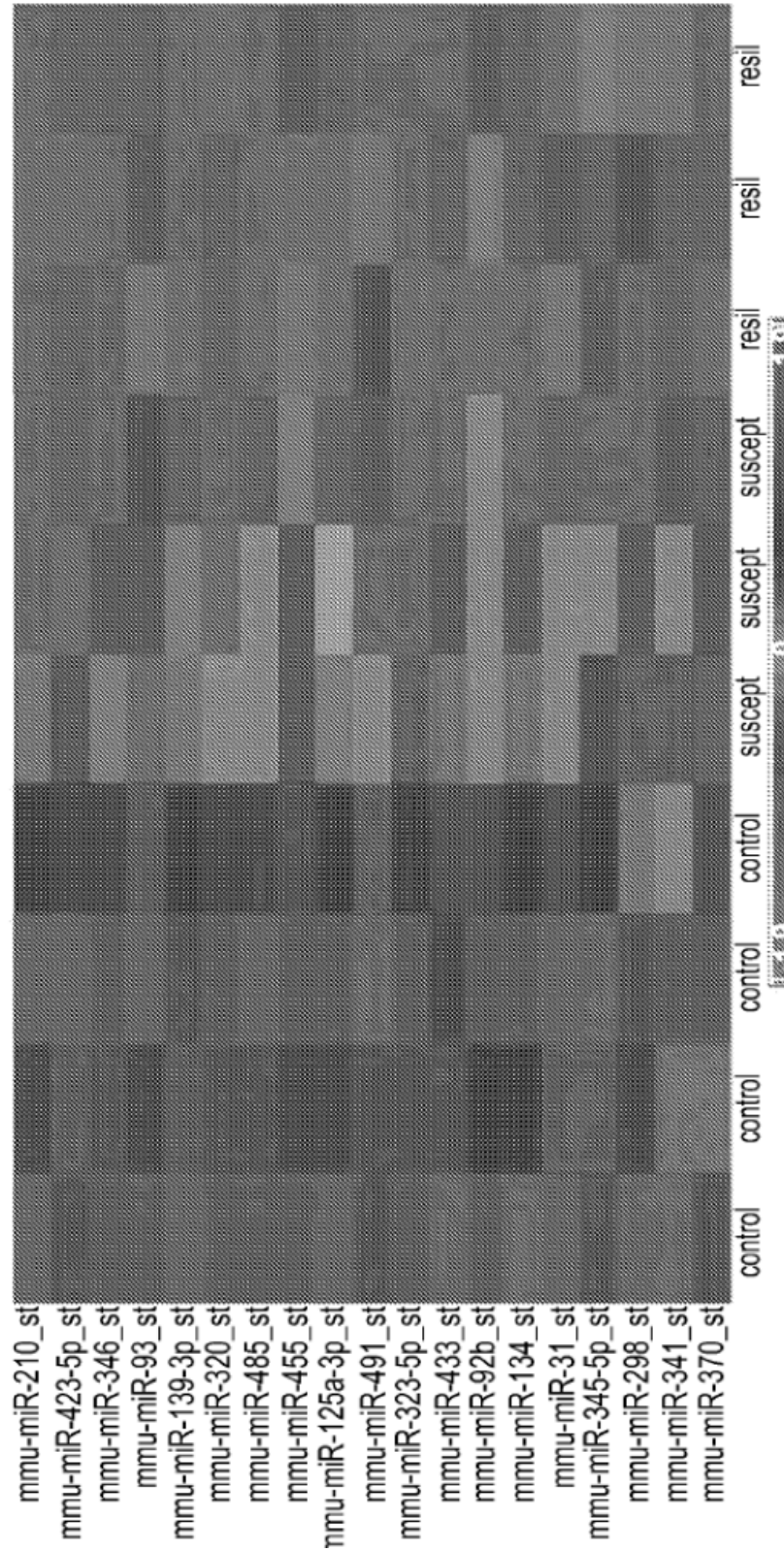


FIG. 20A

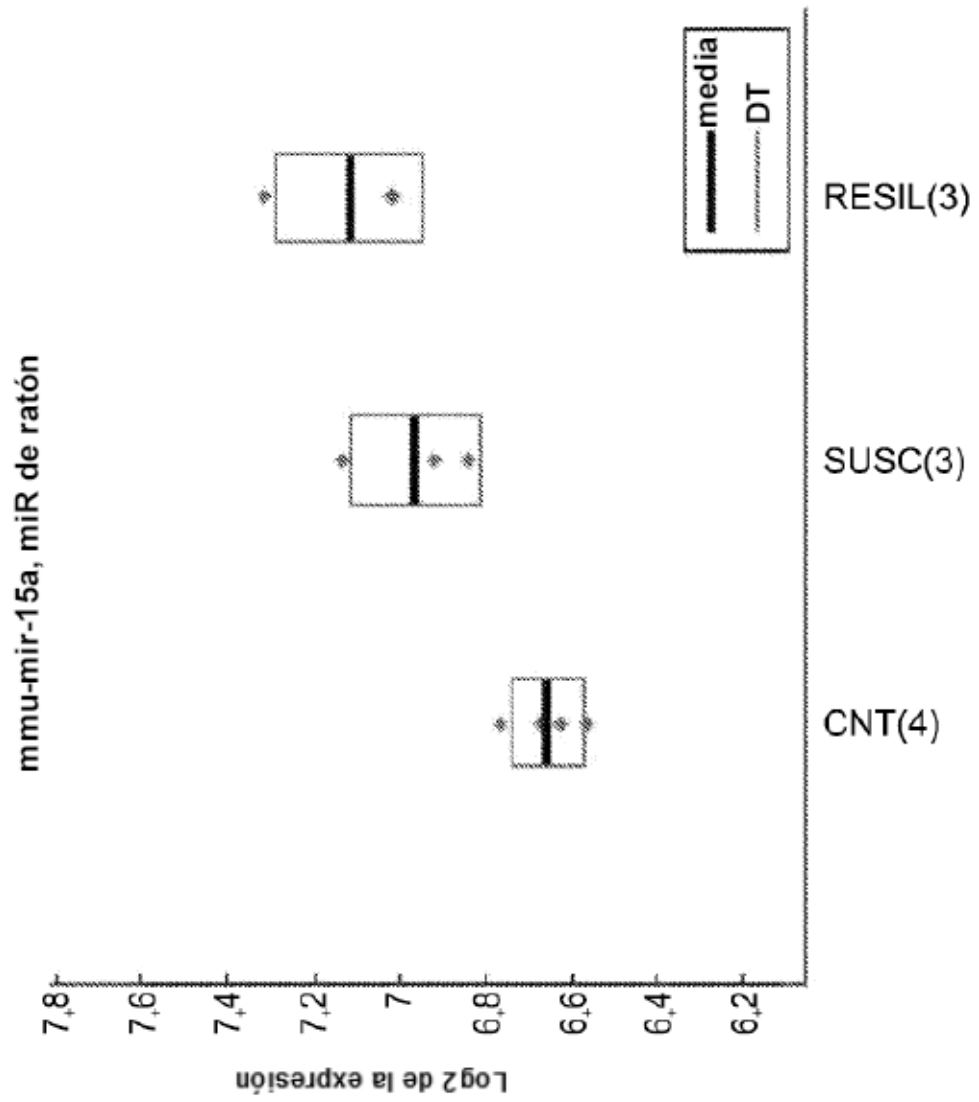


FIG. 20B

Fkbp5, ARNm de ratón

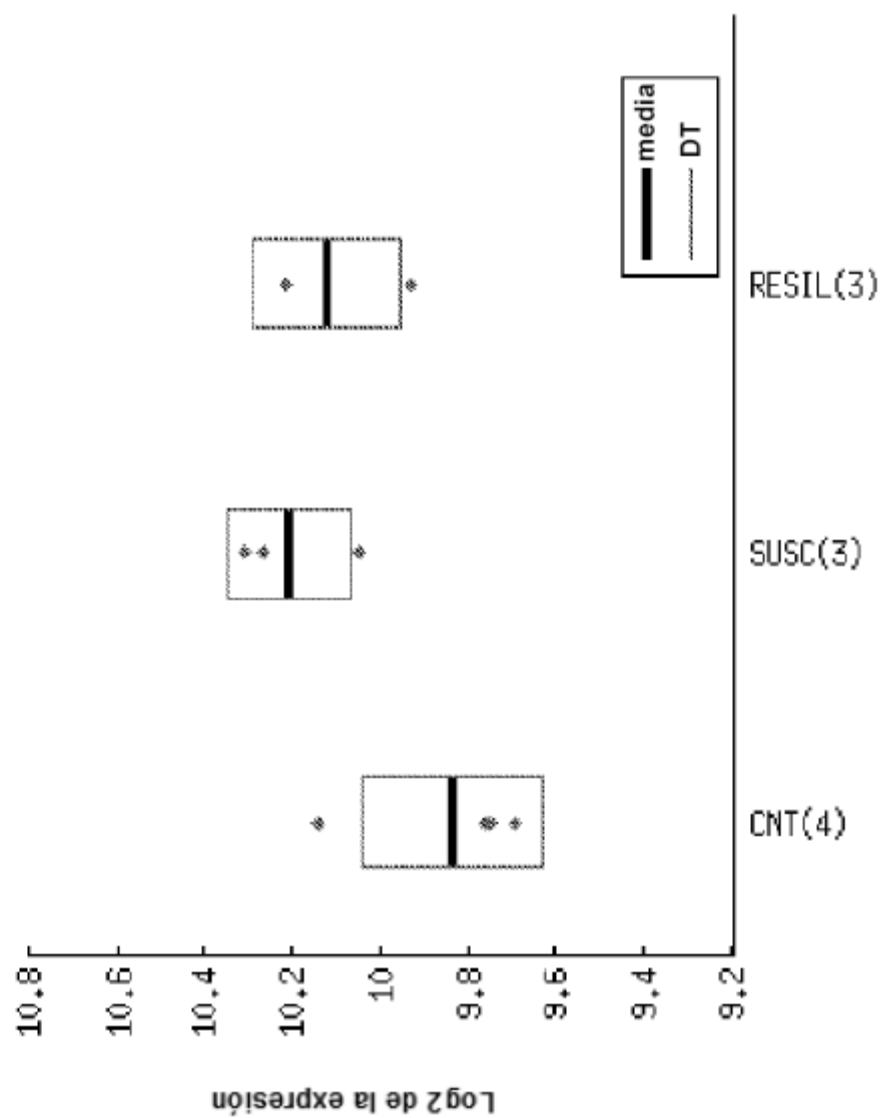


FIG. 20C

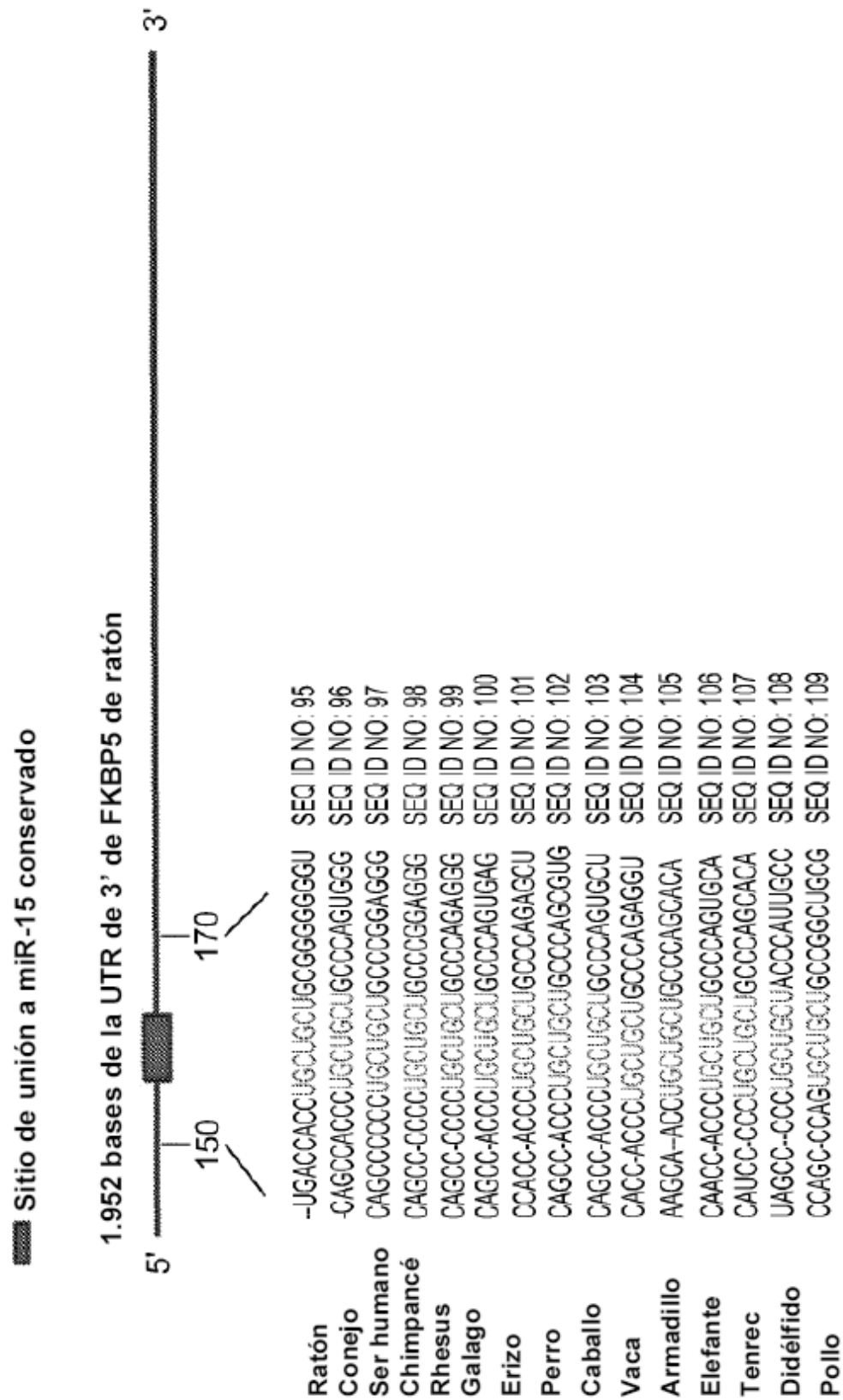


FIG. 21A

Niveles de miR15a en ratones susceptibles con respecto al control tras el rechazo social

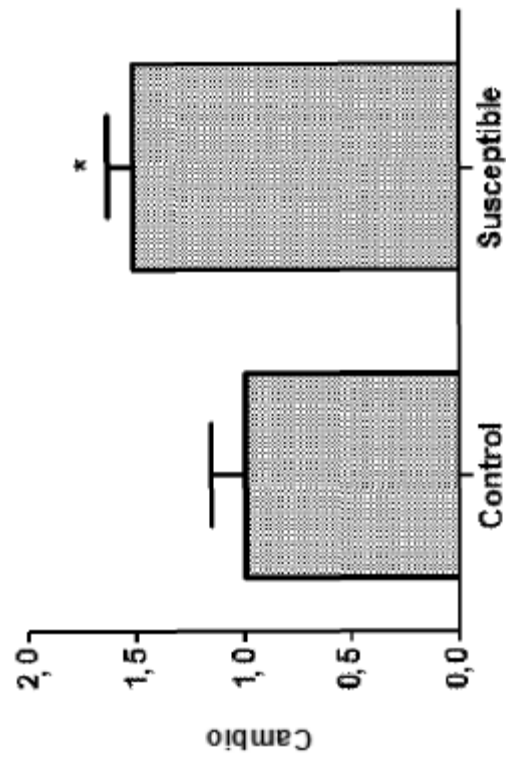


FIG. 21B

Niveles de FKBP5 en ratones susceptibles con respecto al control tras el rechazo social

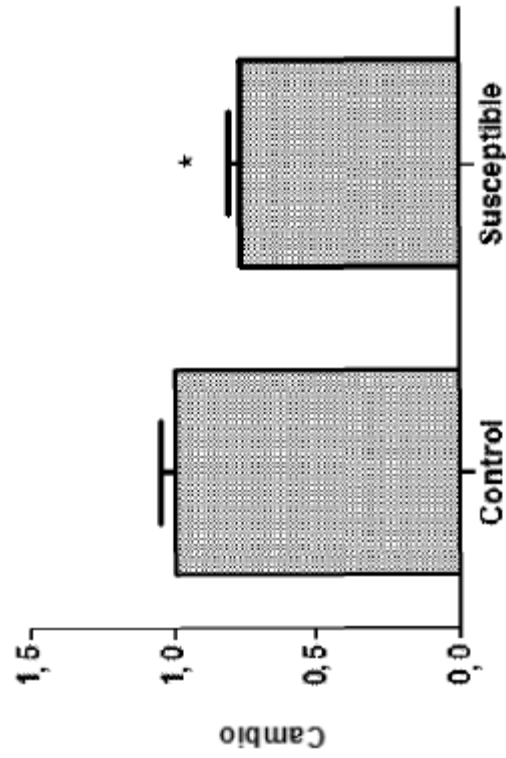


FIG. 22

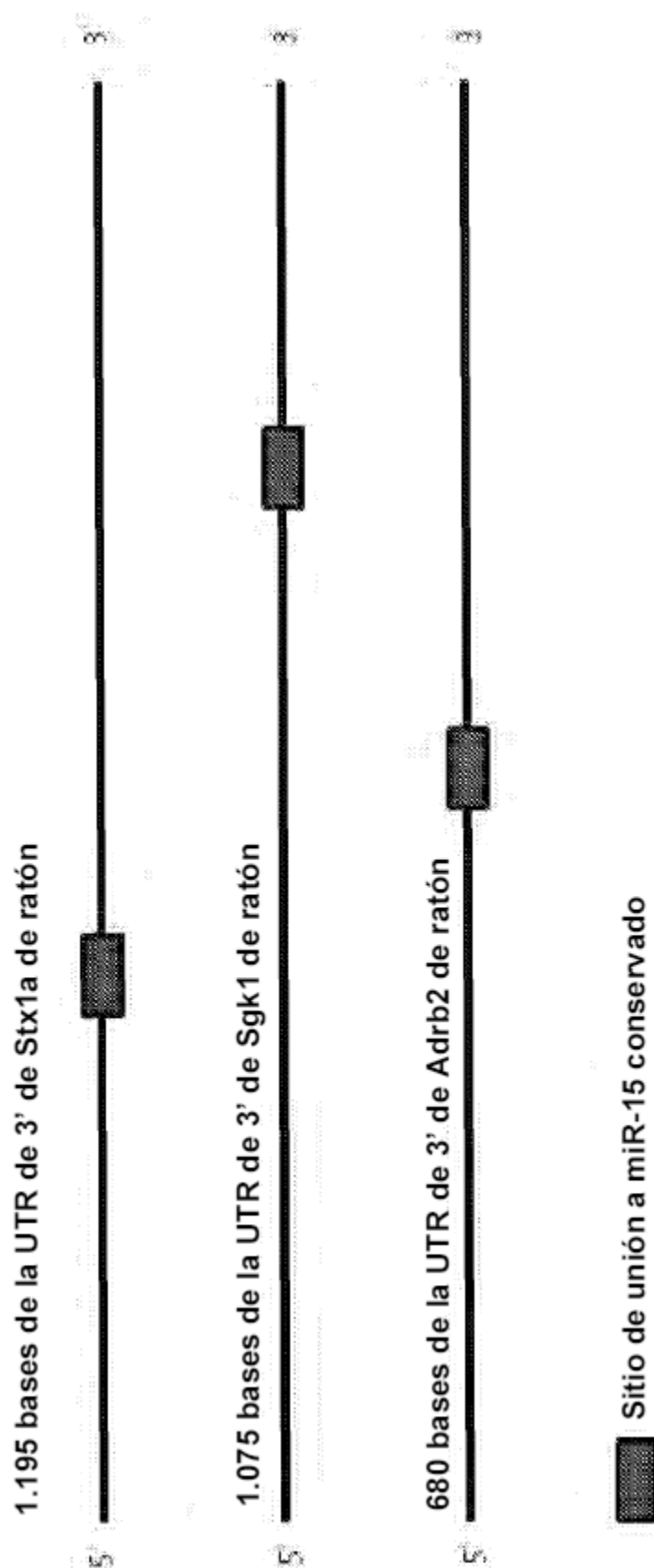


FIG. 23

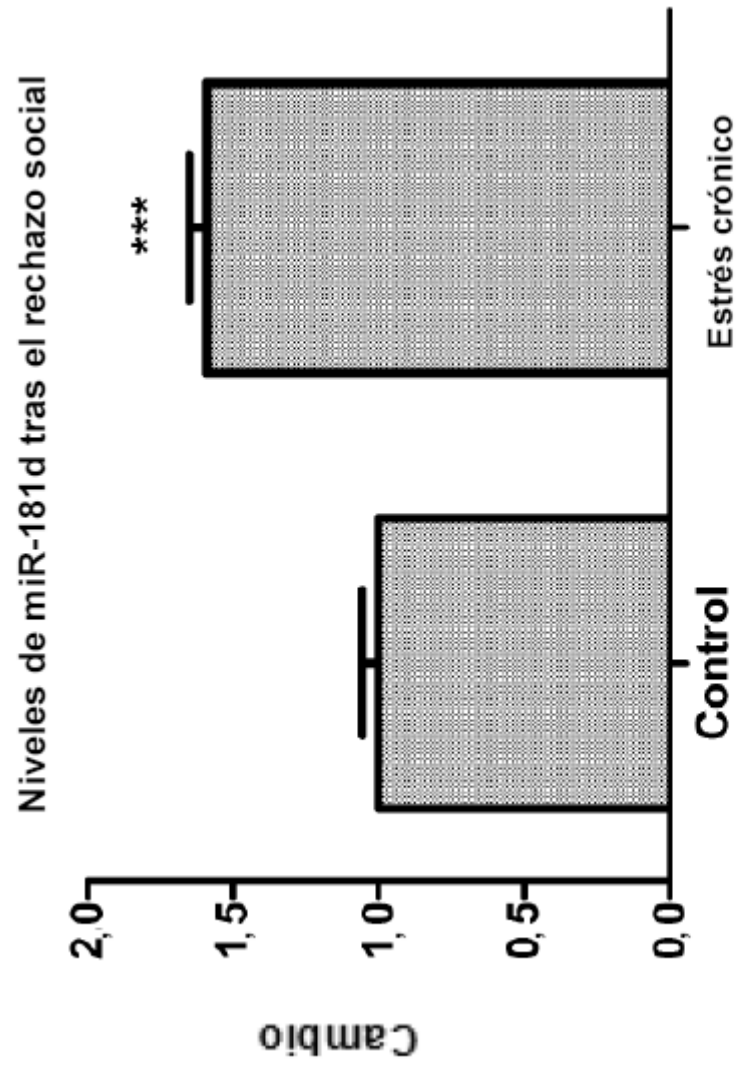


FIG. 24

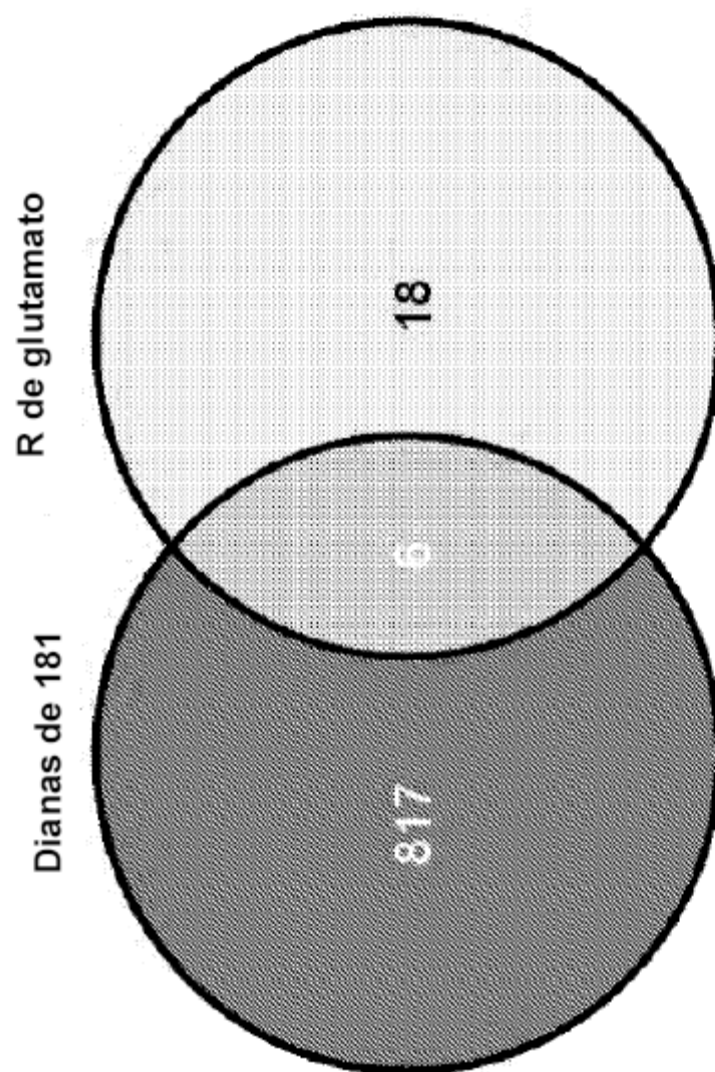


FIG. 25

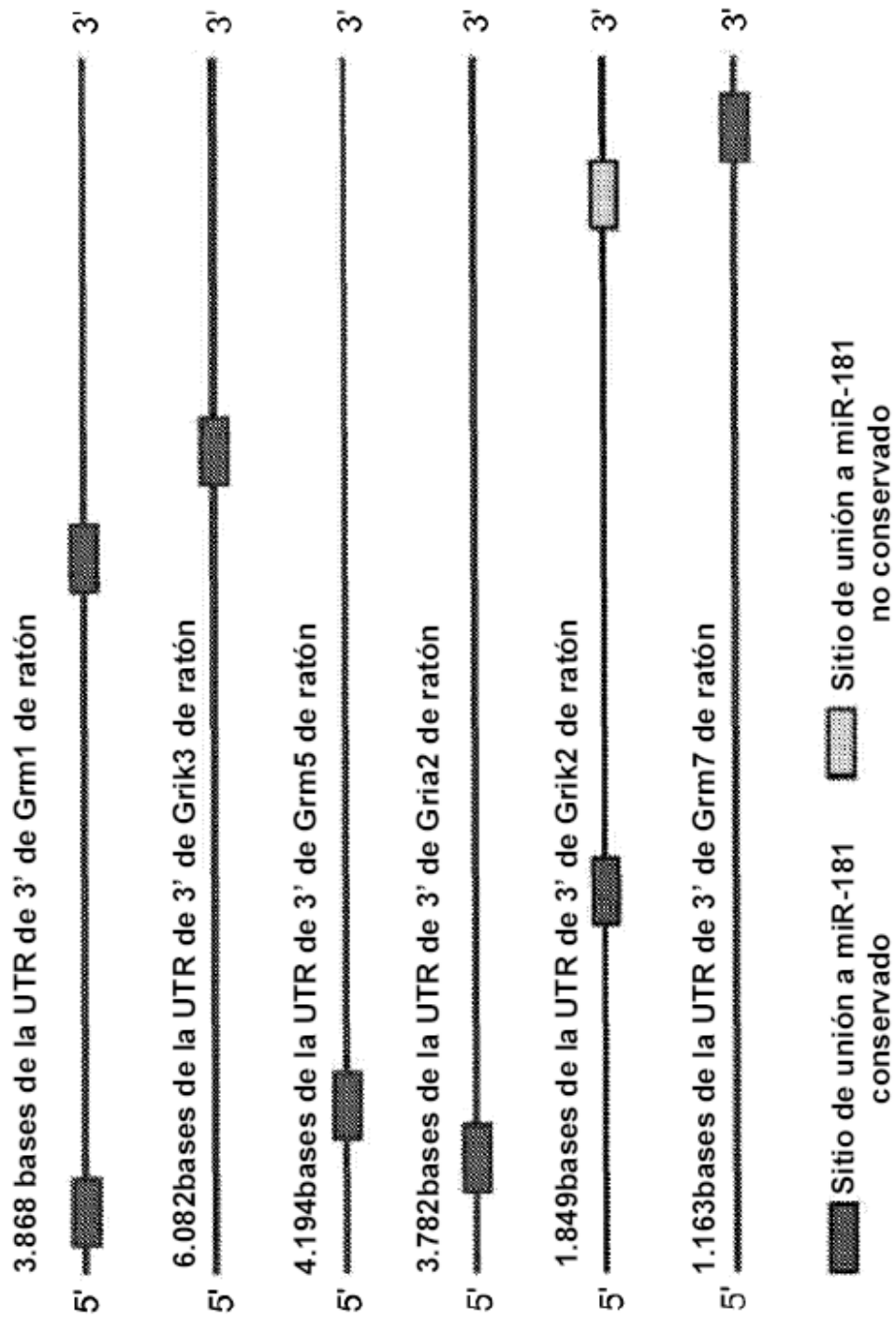


FIG. 26

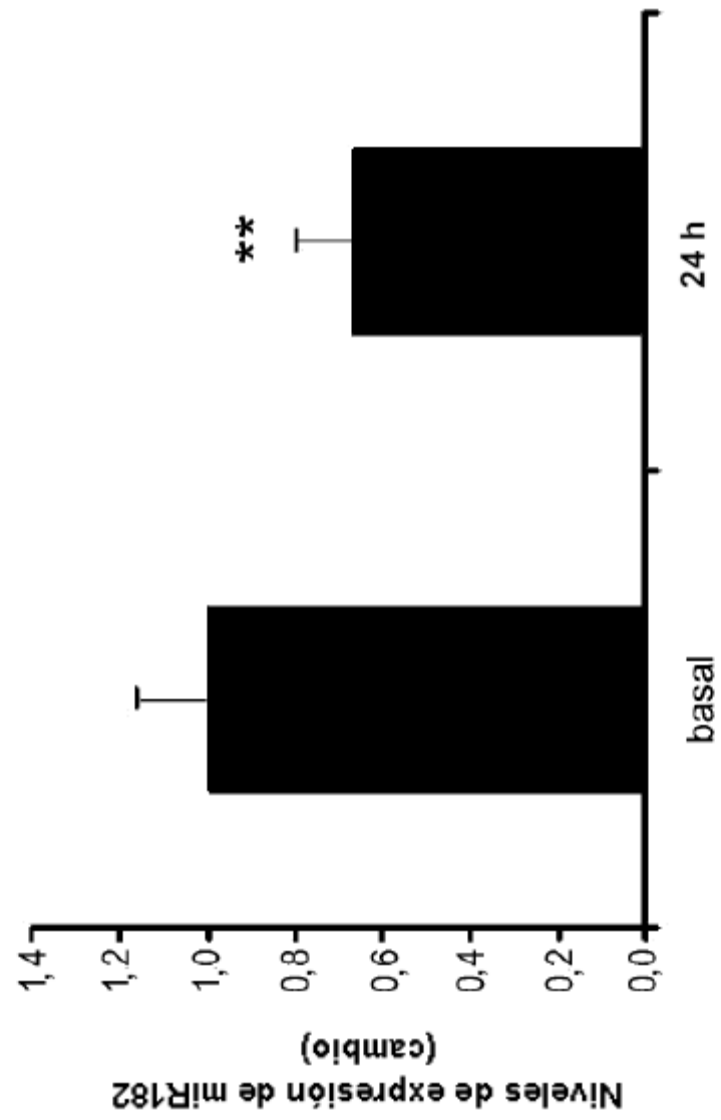


FIG. 27A

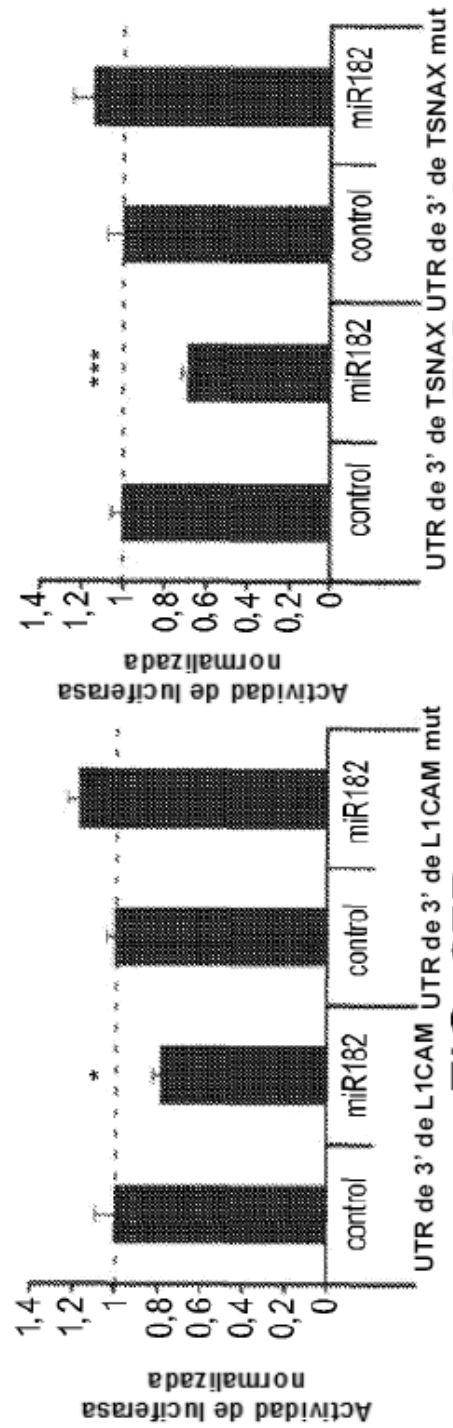
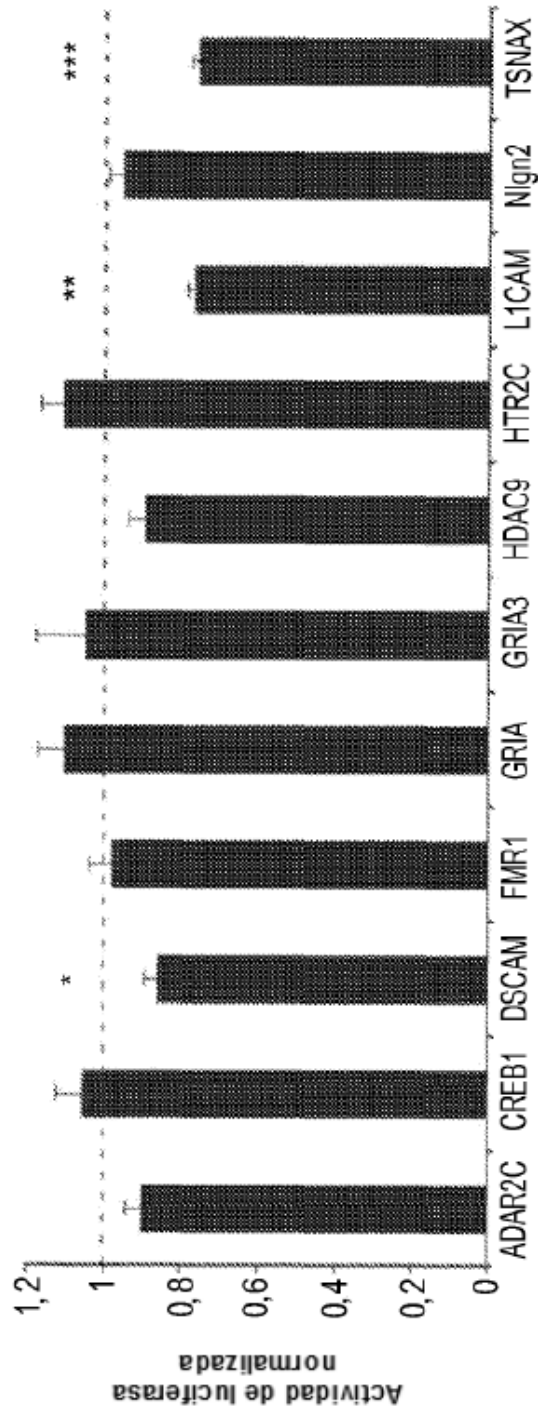


FIG. 27B

FIG. 27C

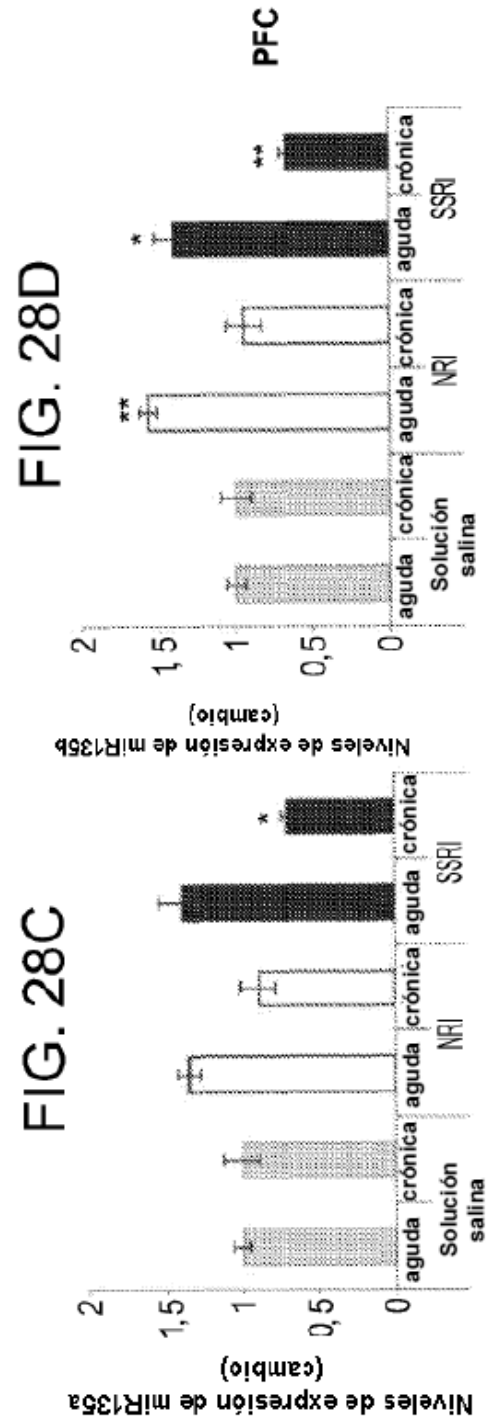
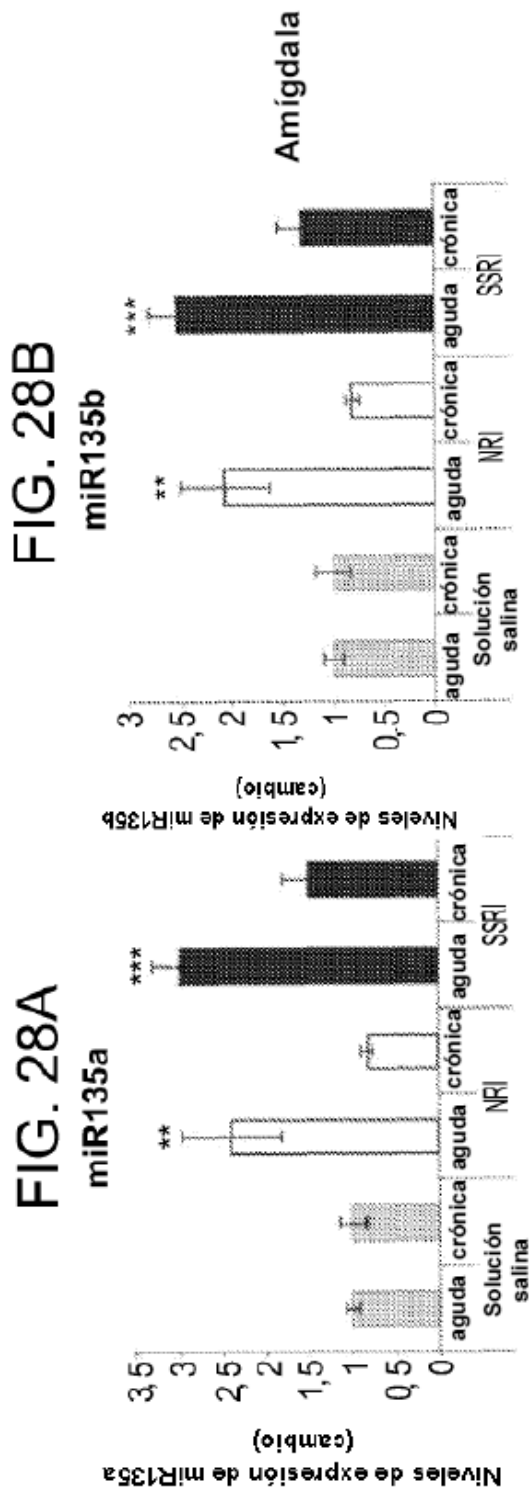


FIG. 28C

FIG. 28D

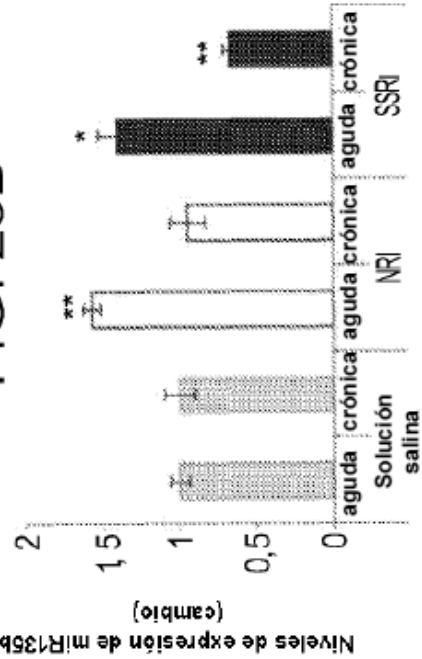
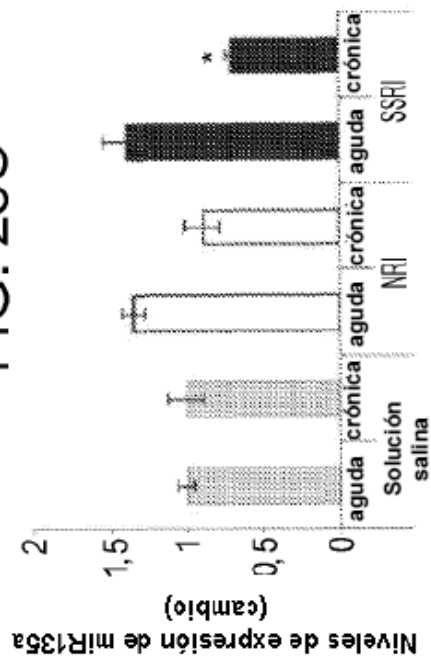


FIG. 29A

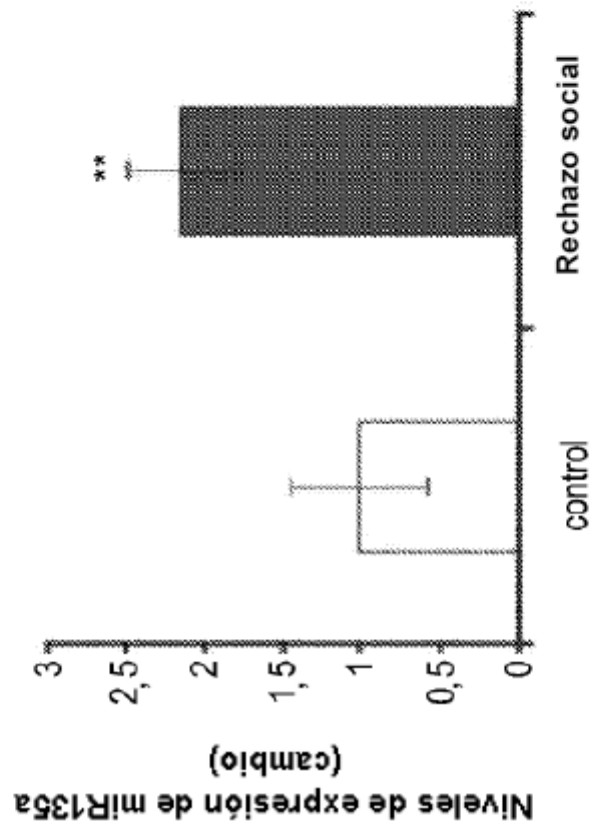


FIG. 29B

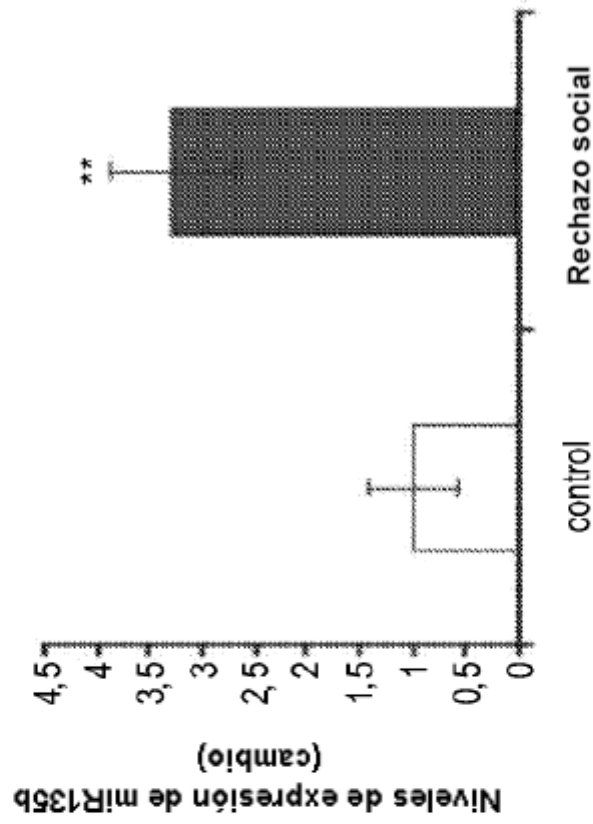


FIG. 30B

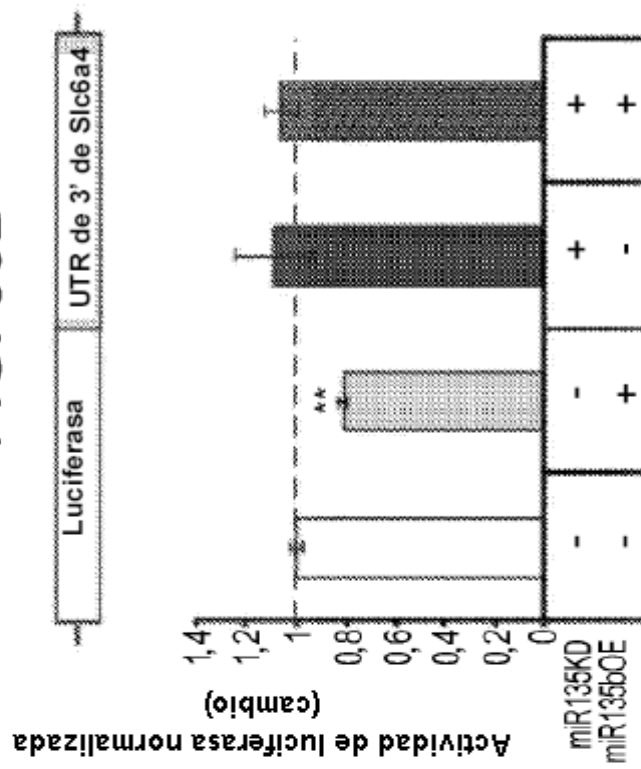


FIG. 30A

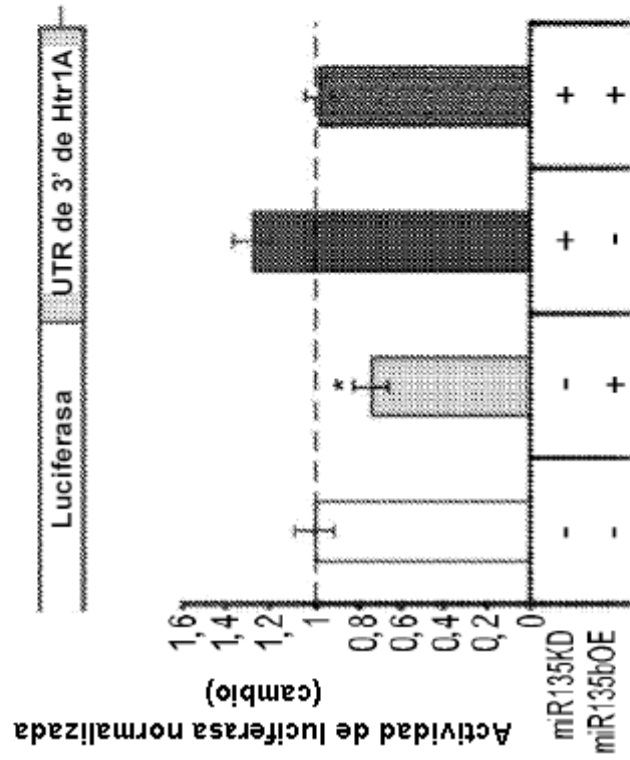


FIG. 30C

- H1 - control KD - CMV-eGFP -
- H1 - miR135 KD - CMV-eGFP -

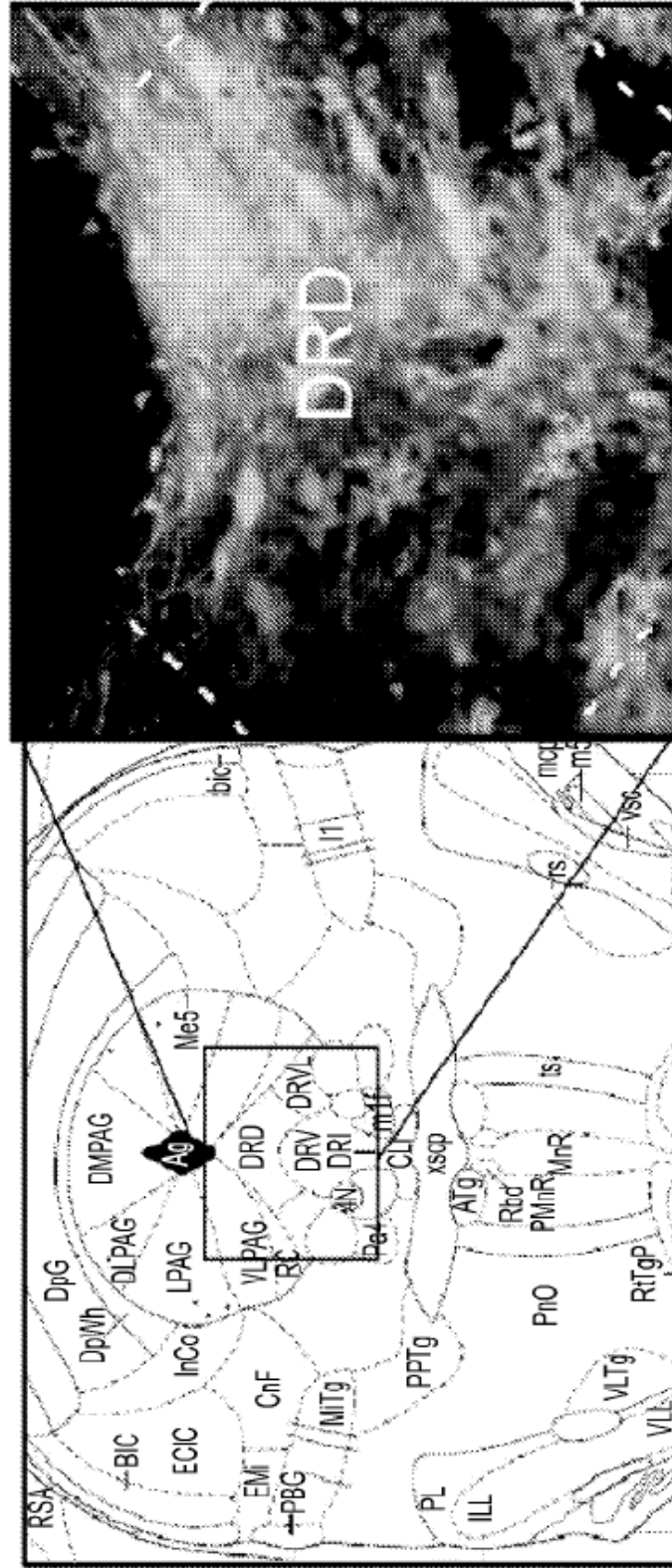


FIG. 30D

FIG. 30E

FIG. 31B

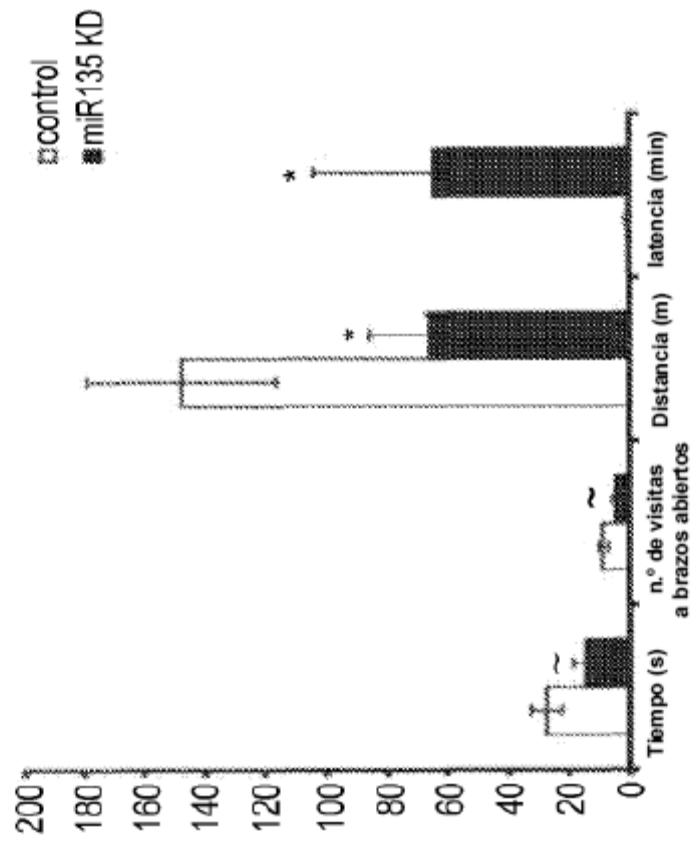


FIG. 31A

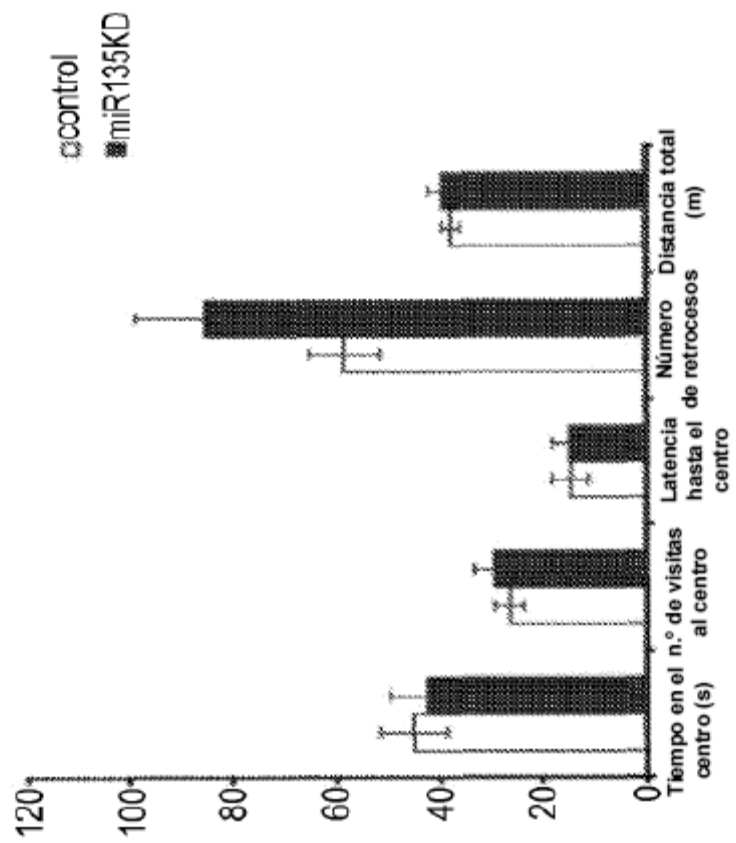


FIG. 31C

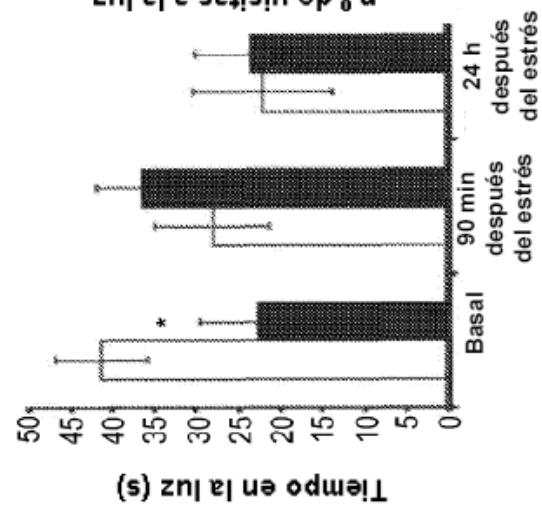


FIG. 31D

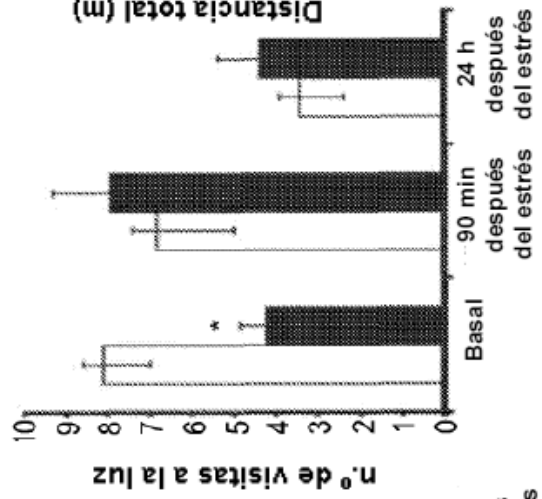


FIG. 31E

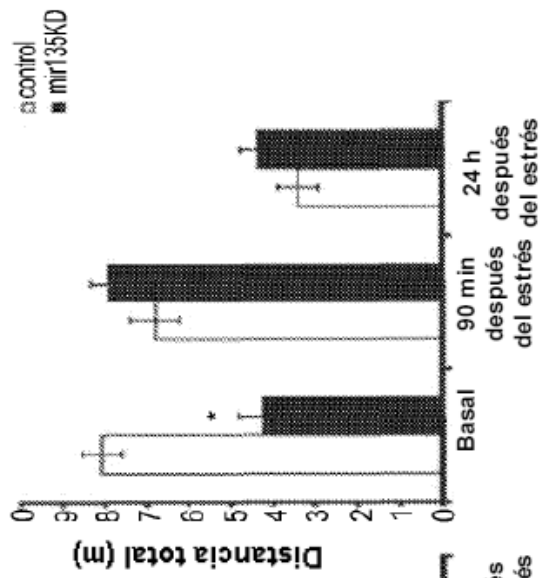


FIG. 31G

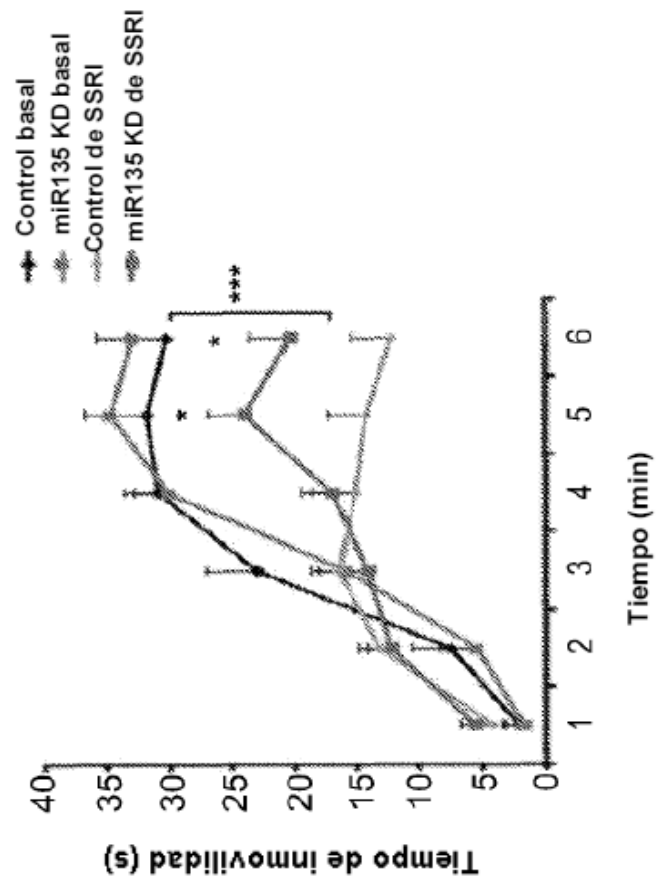


FIG. 31F

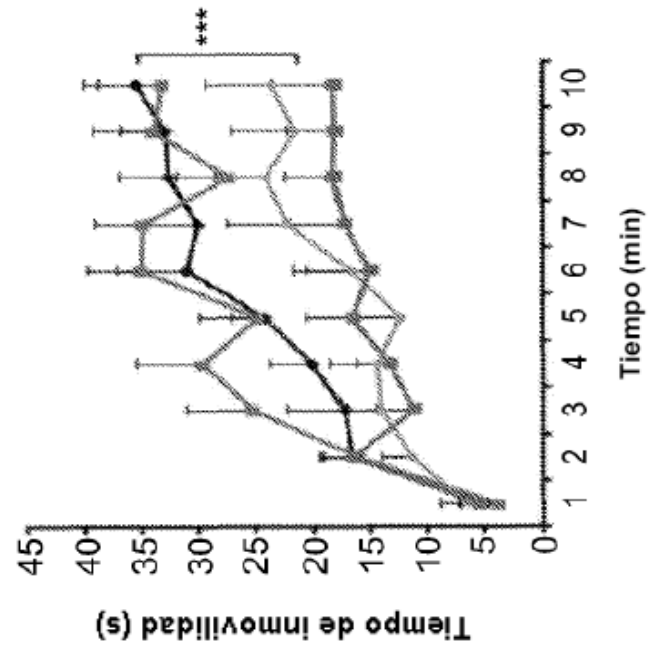


FIG. 32

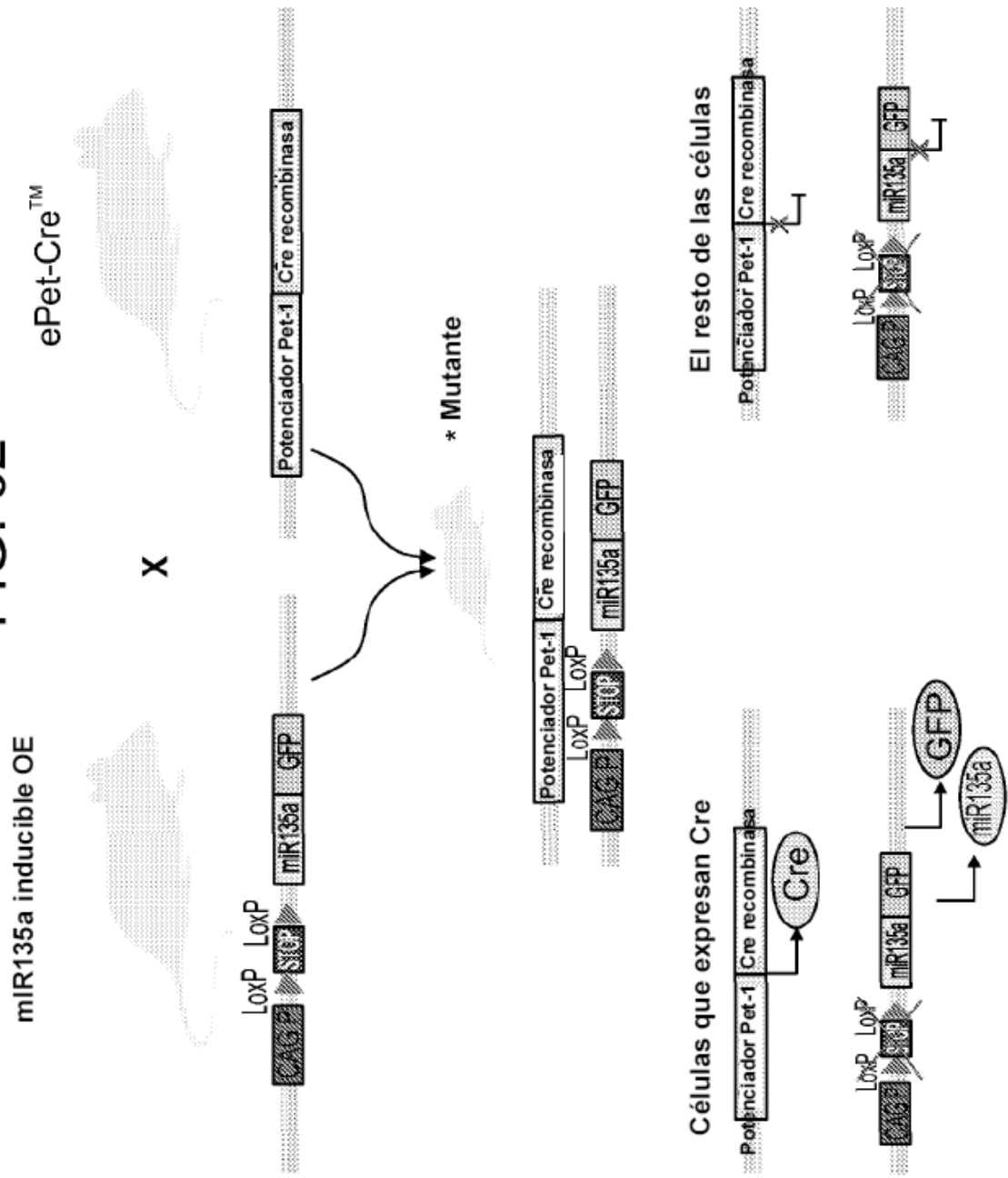


FIG. 33A

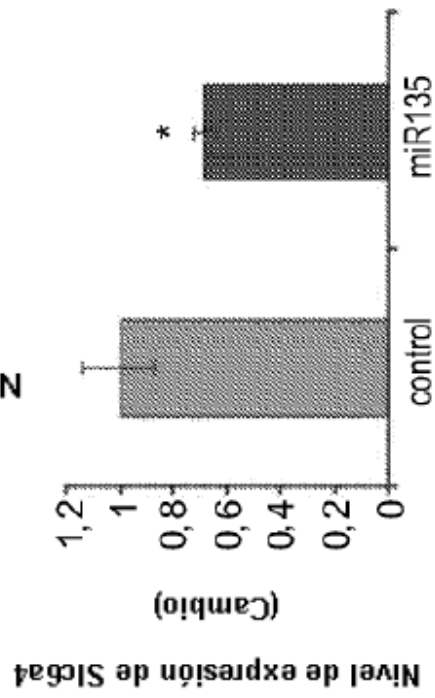
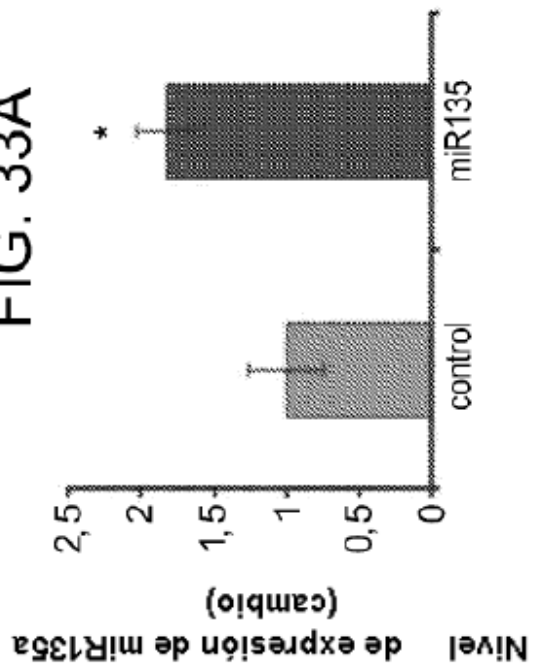


FIG. 33B

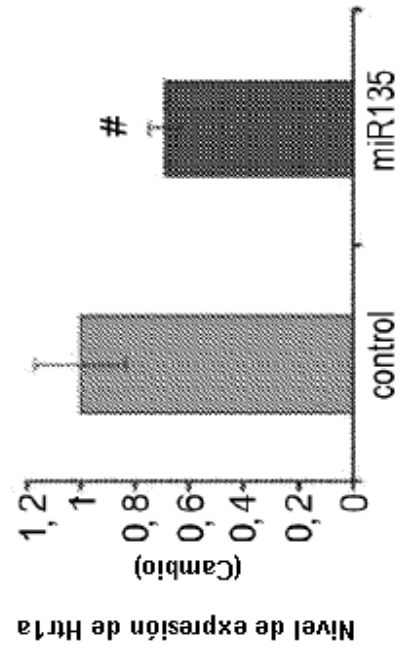


FIG. 33C

FIG. 34A

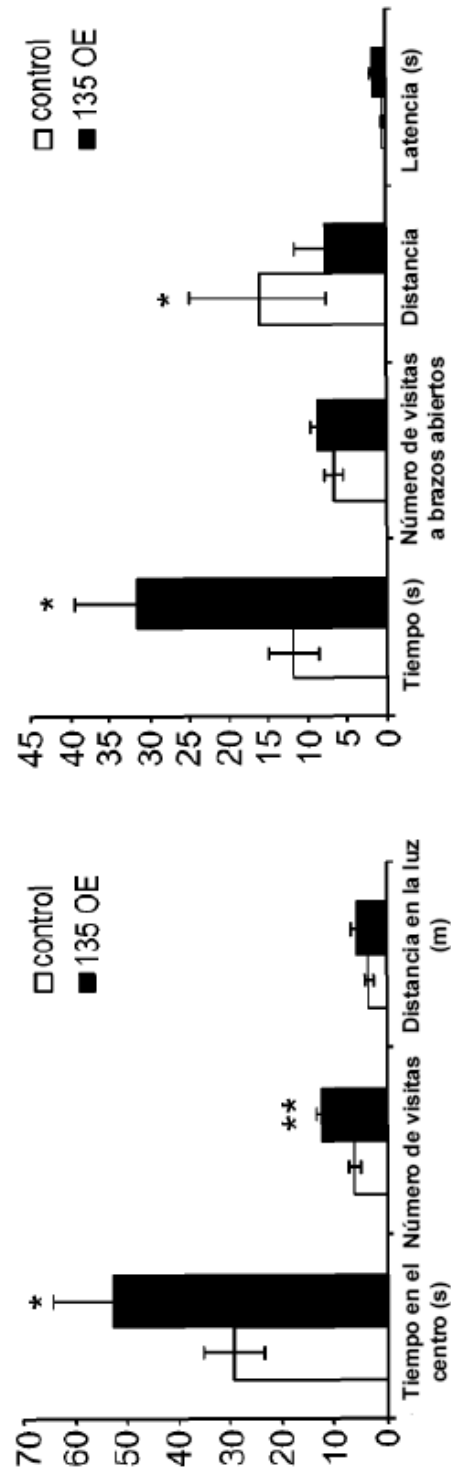
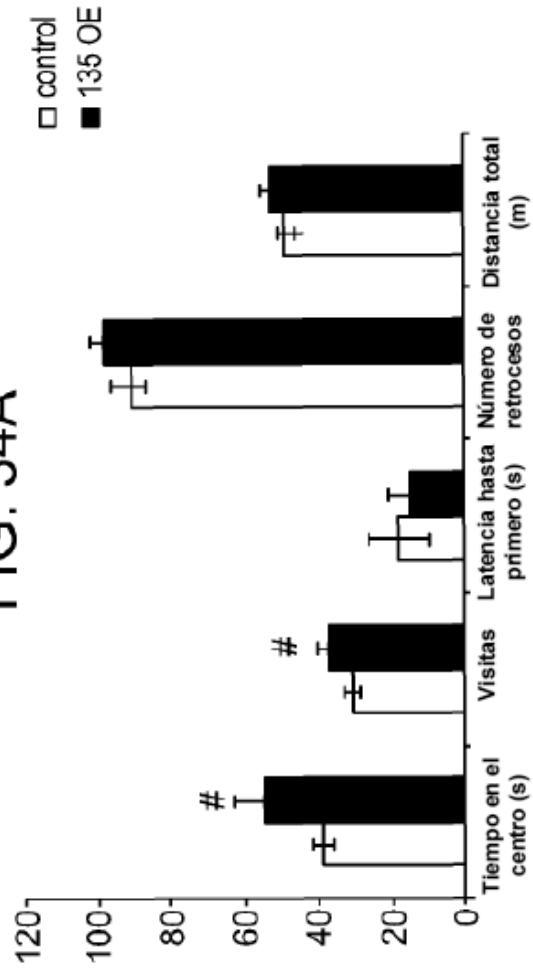
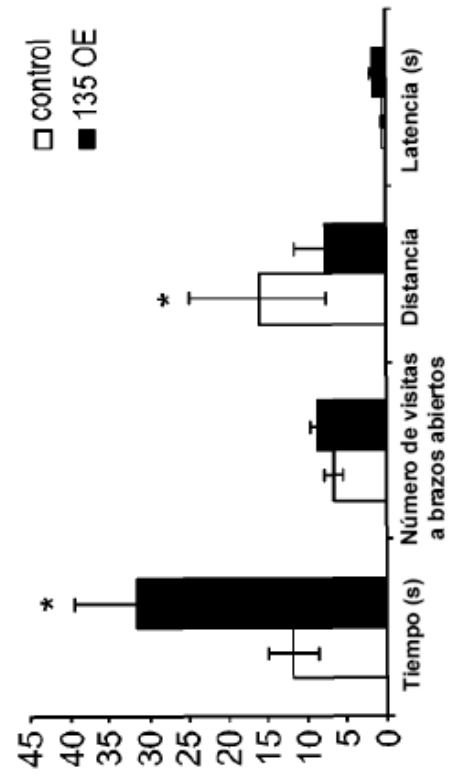


FIG. 34B

FIG. 34C



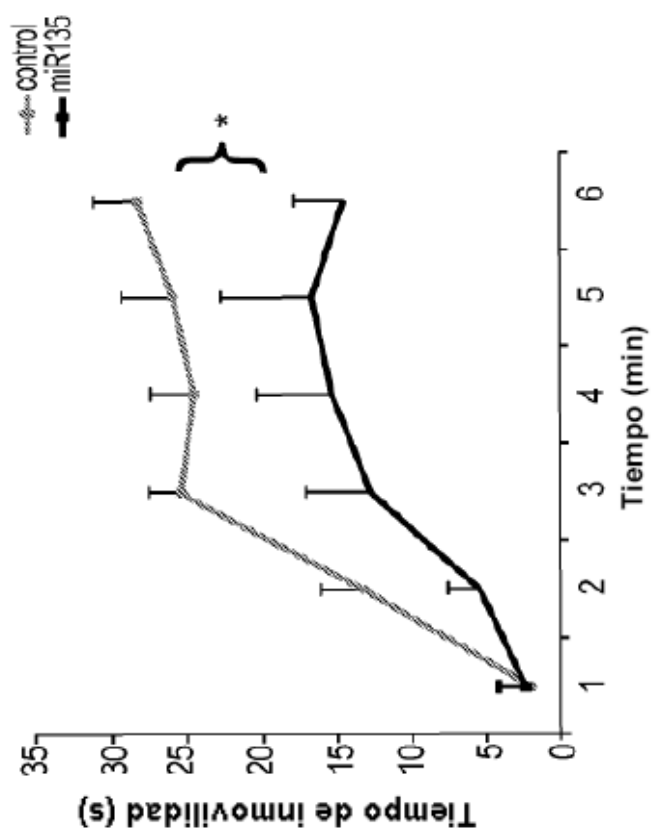


FIG. 34E

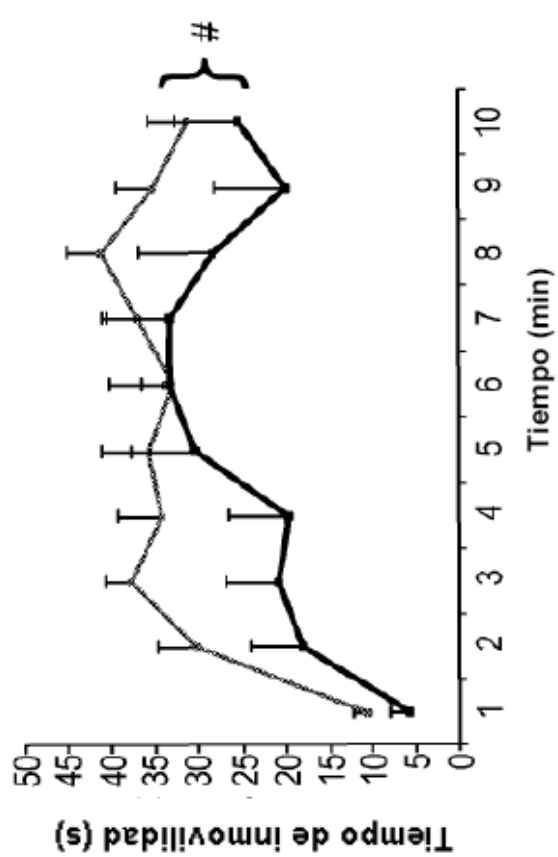


FIG. 34D