

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 188**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.02.2013 PCT/IB2013/050989**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.08.2013 WO13118066**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2013 E 13712915 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 2812449**

54 Título: **Uso de miR-199a-5p, dianas y/o inhibidores del mismo para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de trastornos fibroproliferativos**

30 Prioridad:

06.02.2012 FR 1251089

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

15.11.2017

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (50.0%)
3 rue Michel-Ange
75794 Paris Cedex 16, FR y
CENTRE HOSPITALIER REGIONAL
UNIVERSITAIRE DE LILLE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**POTTIER, NICOLAS;
MARI, BERNARD;
MARCET, BRICE y
BARBRY, PASCAL**

74 Agente/Representante:

POINDRON, Cyrille

ES 2 642 188 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

5 Uso de miR-199a-5p, dianas y/o inhibidores del mismo para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de trastornos fibroproliferativos

5 Campo de la invención

10 La presente invención se refiere al campo de trastornos fibroproliferativos, particularmente fibrosis pulmonar idiopática (FPI), y el papel de microARN (miARN) en el proceso de fibrosis tisular.

10 La presente invención se refiere además específicamente al uso de microARN (miARN), particularmente miR-199a-5p, dianas y/o inhibidores del mismo para el diagnóstico, pronóstico y el tratamiento de trastornos fibroproliferativos, concretamente fibrosis pulmonar idiopática.

15 En la descripción en lo sucesivo en el presente documento, las referencias entre corchetes ([]) se refieren a la lista de referencias proporcionadas al final del texto.

Estado de la técnica relacionada

20 La fibrosis tisular, definida como una formación persistente excesiva de tejido cicatricial conectivo no funcional en respuesta a una lesión tisular crónica, es una causa importante de morbilidad y mortalidad asociadas con pérdida de función del órgano dañado en diversos trastornos tales como los que afectan al intersticio pulmonar [Wynn, J. Clin. Invest., 117: 524-529, 2007] [1]. Los trastornos proliferativos son un problema de salud pública importante. De hecho, solamente en los Estados Unidos, el 45 % de las muertes se atribuyen a trastornos fibroproliferativos y la prevalencia de los mismos está creciendo constantemente [Wynn, Nat. Rev. Immunol., 4: 583-594, 2004] [2].

30 De los trastornos intersticiales pulmonares de origen desconocido, fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es la forma más frecuente y letal con una tasa de supervivencia promedio de 3 a 5 años después del diagnóstico [Wilson y Wynn, Mucosal. Immunol., 2: 103-121, 2009] [3]. La FPI es una enfermedad pulmonar crónica y frecuentemente letal caracterizada por proliferación de fibroblastos y deposición de proteínas de la matriz extracelular excesiva. La FPI es un trastorno poco habitual con una prevalencia de 13 a 20 casos por cada 100.000 habitantes y cuyas causas aún no se entienden bien, y para el que no se dispone en la actualidad ningún tratamiento eficaz.

35 Las observaciones basadas en los modelos de fibrosis pulmonar animal y secciones pulmonares de pacientes con FPI sugieren un proceso biopatológico dinámico que implica formación de tejido cicatricial excesivo con inflamación crónica, apoptosis de células epiteliales y endoteliales, proliferación de células mesenquimatosas y activación con formación de sitios de fibroblastos/miofibroblastos, y finalmente deposición de matriz extracelular excesiva que dan como resultado la destrucción de la estructura pulmonar y pérdida de la función pulmonar. En términos fisiopatológicos, en la actualidad, el daño del epitelio alveolar repetido se considera responsable de lesiones en el epitelio pulmonar que promueven la formación de exudado de plasma alveolar y activación del proceso de coagulación, secreción de factor de crecimiento tal como TGFβ por neumocitos que permite el reclutamiento de fibroblastos pulmonares, proliferación y activación y deposición de matriz extracelular anómala y excesiva [Wilson y Wynn, 2009, citado anteriormente] [3]. Durante el proceso de fibrosis, los fibroblastos tienen un fenotipo de miofibroblasto y se organizan en focos fibroblásticos. Otros mecanismos también pueden estar implicados en el proceso de fibrosis tal como transición epitelial mesenquimal de células epiteliales, endoteliales o mesoteliales y reclutamiento de fibrocitos en circulación medulares pulmonares [Wilson y Wynn, 2009, citado anteriormente] [3].

50 Los microARN (miARN) son una clase de ARN no codificante pequeño con aproximadamente 22 bases y que tiene un papel clave en una amplia serie de fenómenos celulares tales como desarrollo, diferenciación, supervivencia, respuesta a tensión, apoptosis, proliferación, homeostasis o diferenciación [Ambros, Nature, 431: 350-355, 2004] [4].

55 Estudios recientes han identificado perfiles de expresión de miARN específicos asociados con el inicio y la progresión de diversos trastornos incluyendo cáncer y trastornos inflamatorios y autoinmunitarios. Además, los estudios de ganancia y pérdida de función de miARN han revelado funciones de miARN patógenas que acentúan el papel importante del mismo *in vivo*. Preferentemente, el término "microARN" o "miARN", en el contexto de la presente invención, significa un oligonucleótido de ARN que consiste en entre 18 y 25 nucleótidos de longitud. En términos funcionales los miARN son típicamente moléculas de ARN endógeno reguladoras.

60 El mecanismo de acción de los mismos implica la formación de un complejo entre una pluralidad de bases de miARN y la parte no codificante 3' del ARNm diana [Brennecke *et al.*, PLoS. Biol., 3: e85, 2005] [5]. Esta interacción da lugar a la desestabilización del ARNm diana y/o la inhibición de la síntesis de proteínas [Brennecke *et al.*, 2005, citado anteriormente] [5]. El reconocimiento entre miARN y la diana mismo está controlado esencialmente por una secuencia de aproximadamente 7 bases, situada en la parte 5' del miARN (secuencia de reconocimiento o semilla) [Brennecke *et al.*, 2005, citado anteriormente] [5]. Por esta razón, cada miARN parecería capaz de regular la estabilidad de una amplia serie de ARNm distintos. Las expresiones "gen diana" o "ARNm diana" se refieren a dianas de ARNm regulador de microARN, en las que dicho "gen diana" o "ARNm diana" está regulado

postranscripcionalmente por el microARN basado en complementariedad casi perfecta o perfecta entre el miARN y su sitio diana que da como resultado escisión de ARNm diana; o complementariedad limitada, conferida con frecuencia a complementariedad entre la denominada secuencia semilla (nucleótidos 2-7 del miARN) y el sitio diana que da como resultado inhibición de la traducción del ARNm diana.

Se han identificado aproximadamente 2.000 miARN en seres humanos hasta la fecha (miRBase versión 19 <http://www.mirbase.org>) donde parecerían regular más del 30 % de los transcritos. La regulación del miARN se considera por lo tanto una forma importante de regulación de la expresión génica, cuya influencia se ha infravalorado ampliamente hasta ahora [Xie *et al.*, *Nature*, 434: 338-345, 2005; Berezikov *et al.*, *Cell*, 120: 21-24, 2005] [6, 7].

Los miARN se transcriben en el núcleo en forma de precursores largos (pri-miARN) y experimentan una primera etapa de maduración en el núcleo para producir pre-miARN que tiene una estructura en horquilla más pequeña. Este precursor de miARN se exporta por lo tanto del núcleo al citoplasma donde experimenta una etapa de maduración final con enzima Dicer que genera dos miARN monocatenarios (una cadena de 5p y una cadena de 3p): la cadena "madura" es captada por un complejo multiprotéico (Complejo Silenciador Inducido por ARN o RISC) que interacciona con la parte no codificada de 3' del ARNm diana, mientras que la cadena complementaria "estrella" experimenta degradación (anotación: miR-xx*).

En términos clínicos, numerosos estudios sugieren un posible uso de miARN, como una herramienta de diagnóstico. De hecho, los miARN presentan buena estabilidad en líquidos biológicos tales como suero [Mitchell *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 105: 10513-10518, 2008] [8] u orina [Weber *et al.*, *Clin. Chem.*, 56: 1733-1741, 2010] [9]. Por esta razón, el estudio de la expresión de los mismos en estos medios biológicos ofrece nuevas perspectivas no invasivas para el desarrollo de nuevos biomarcadores de diagnóstico o pronóstico. Además, los perfiles de expresión tisular de miARN también ofrecen nuevas herramientas de pronóstico o diagnóstico como ya se ha demostrado en el tratamiento del cáncer [Lu *et al.*, *Nature*, 435: 834-838, 2005] [10]. Por ejemplo, miR-199a-5p, una de las dos especies de miARN maduras derivadas del precursor miR-199a, se ha asociado con tumores malignos no solamente en carcinoma hepatocelular [Jiang *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 14(2): 419-427, 2008] [11] sino también en tumores bronquiales [Mascaux *et al.*, *Eur. Respir. J.*, 33(2): 352-359 (Epub 2008), 2009; Puissegur *et al.*, *Cell death Differ.*, 18(3): 465-478, 2011] [12, 13].

En términos terapéuticos, la modulación de la expresión de miARN también podría permitir el desarrollo de nuevos tratamientos [Krutzfeldt *et al.*, *Nature*, 438: 685-689, 2005] [14]. Por ejemplo, el uso del inhibidor de miR-122 en el desarrollo de nuevos tratamientos de hepatitis C ha hecho posible obtener una reducción significativa en la carga vírica de este virus [Lanford *et al.*, *Science*, 327: 198-201, 2010] [15].

A pesar de pruebas crecientes sobre la implicación de miARN en el proceso de fibrosis tisular, el papel preciso de los mismos y el mecanismo o los mecanismos de acción de los mismos aún deben explorarse exhaustivamente [Jiang *et al.*, *FEBS J.*, 277: 2015-2021, 2010] [16]. Aunque la causa de FPI se desconoce, se ha sugerido recientemente un papel central de los miARN en la patogénesis de la misma. Sin embargo, el papel de los miARN en trastornos fibróticos, particularmente en fibrosis pulmonar, está escasamente documentado y solamente se han estudiado algunos miARN tales como miR-21 o let7-d hasta la fecha [Liu *et al.*, *J. Exp. Med.*, 20: 1589 - 1597, 2010; Pandit *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 182: 220 - 229, 2010] [17, 18]. Por lo tanto, los miARN para los que la expresión está asociada con fibrosis pulmonar podrían ofrecer herramientas particularmente prometedoras para el desarrollo de nuevos marcadores de diagnóstico y pronóstico de FPI y nuevas estrategias terapéuticas para este trastorno que continúa siendo incurable y tiene un mal pronóstico [Pandit *et al.*, *Transl. Res.*, 157: 191-199, 2011] [19].

Descripción de la invención

Los inventores han demostrado, por primera vez y de forma completamente inesperada, el papel de miARN, particularmente mi-199a-5p, y las dianas de los mismos en la fibrosis pulmonar, hepática y renal.

Los inventores han usado más específicamente un modelo de fibrosis pulmonar experimental para identificar, en el pulmón, i) miARN expresados diferencialmente solamente en ratones C57BL/6 sensibles a fibrosis pulmonar inducida por bleomicina y ii) miARN correlacionados durante la progresión del proceso fibrótico. Para este fin, los inventores han usado diversos enfoques experimentales que combinan microplacas biológicas de miARN, hibridación *in situ* y RT-PCR cuantitativa.

De esta manera, han identificado un perfil de expresión de 22 miARN específicos con respecto a la respuesta pulmonar de ratones C57BL/6 sensibles a fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.

Entre los 22 miARN del perfil de expresión identificado, han demostrado, por primera vez, el papel único de miR-199a-5p en el proceso de fibrosis pulmonar. De esta manera, han identificado regulación positiva de miR-199a-5p significativa en los pulmones de ratones con fibrosis inducida por bleomicina. De hecho, parecería que miR-199a-5p es el miARN más diferenciador entre cepas de ratón C57BL/6 sensibles y cepas de ratón Balb/c resistentes con

respecto a fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, permitiendo de este modo una distinción entre casos patológicos y normales.

5 También se ha identificado regulación positiva de miR-199a-5p significativa en los pulmones de pacientes que padecen FPI. Más específicamente, los niveles de miR-199a-5p han aumentado selectivamente en los miofibroblastos de pulmones dañados.

10 En consecuencia, los efectos profibróticos de miR-199a-5p se han estudiado adicionalmente en fibroblastos pulmonares. De esta manera, demostraron la activación de fibroblastos pulmonares a un fenotipo profibrótico después de sobreexpresión de miR-199a-5p. Finalmente, los inventores han demostrado que la sobreexpresión de miR-199a-5p imita parcialmente la identificación transcripcional y los efectos celulares de TGF β , uno de los principales factores implicados en los mecanismos fibróticos, que también es capaz de aumentar la expresión de miR-199a-5p.

15 También han demostrado que el papel de miR-199a-5p puede extrapolarse a otros trastornos fibróticos en mamíferos ya que este miARN es común para las diversas formas de fibrosis pulmonar, hepática y renal; y por lo tanto podría convertirse en un marcador universal de las mismas. De hecho, han demostrado expresión de miR-199a-5p anómala en modelos de fibrosis renal y hepática de ratón, lo que demuestra que la desregulación de miR-199a-5p representa un mecanismo general que contribuye al proceso de fibrosis.

20 Además, los inventores han combinado enfoques por ordenador (software de bioinformática de predicción de diana) y enfoques experimentales (microplacas de transcriptoma, expresión de miARN eptópico y vectores indicadores que contiene la parte 3'-UTR de un gen de interés fusionado con luciferasa) para determinar y caracterizar los genes diana regulados específicamente por miR-199a-5p. En particular, se ha observado variación en la expresión del gen que codifica caveolina-1 (CAV1), un mediador crítico en fibrosis pulmonar, de acuerdo con el nivel de expresión de miR-199a-5p. De esta manera, han identificado CAV1 como una diana genuina de miR-199a-5p.

25 La presente invención se refiere por tanto a un método de diagnóstico *in vitro* para un trastorno fibroproliferativo en un sujeto caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

- 30 (i) medición cuantitativa del nivel de la expresión de miR-199a-5p en una muestra biológica de dicho sujeto;
- (ii) comparar el perfil de expresión de miR-199a-5p de la muestra biológica de dicho sujeto con el mismo perfil de expresión de miARN de una muestra biológica de referencia;
- 35 (iii) identificar y medir en la muestra biológica de dicho sujeto la expresión de un gen diana para el que el nivel de expresión está regulado por el nivel de miR-199a-5p identificado en la etapa (ii), en el que dicho gen diana codifica caveolina-1;
- (iv) comparar la expresión de caveolina-1 en la muestra biológica de dicho sujeto con la expresión de caveolina-1 de una muestra biológica de referencia; y
- 40 (v) determinar si los niveles de la expresión de miR-199a-5p y de la expresión de caveolina-1 están asociados con trastorno proliferativo.

De acuerdo con una realización particular, los 22 miARN del perfil de expresión específico para la respuesta pulmonar a fibrosis pulmonar inducida por bleomicina están representados por los siguientes números de referencia:

Nombre del miARN	Número de referencia de miRBase
mir-146b	MIMAT0003475
mir-34a	MIMAT0000542
mir-21	MIMAT0000530
mir-449a	MIMAT0001542
mir-449b	MIMAT0005447
mir-20a	MIMAT0000529
mir-18a	MIMAT0000528
mir-223	MIMAT0000665
mir-449c	MIMAT0003460
mir-147b	MIMAT0004857
mir-152	MIMAT0000154
mir-181ac	MIMAT0000210

Nombre del miARN	Número de referencia de miRBase
mir-451	MIMAT0001632
mir-351	MIMAT0000609
mir-133ac	MIMAT0000145
mir-214	MIMAT0000661
mir-199a-5p	MIMAT0000229
mir-132	MIMAT0000144
mir-222	MIMAT0000670
mir-342-3p	MIMAT0000590
mir-345-5p	MIMAT0000595
mir-221	MIMAT0000669

La expresión " trastorno fibroproliferativo" de acuerdo con la presente invención se refiere a trastornos caracterizados por una lesión orgánica parenquimal y fibrosis. Por ejemplo, se refiere a fibrosis pulmonar, hepática y renal o particularmente fibrosis pulmonar idiopática (FPI).

5 El término "sujeto" de acuerdo con la presente invención se refiere a un vertebrado, particularmente un mamífero, más particularmente un ser humano.

10 La expresión "muestra biológica" de acuerdo con la presente invención se refiere a una biopsia bronquial, hepática o renal. Por ejemplo, se refiere a tejido epitelial, particularmente del epitelio respiratorio, hepático o renal.

15 La expresión "muestra biológica de referencia" de acuerdo con la presente invención se refiere a una muestra biológica como se ha definido anteriormente obtenida de un sujeto sano, es decir que no presenta fibrosis, o un sujeto en el que se conoce la expresión de miR-199a-5p y esta está asociada con un estadio clínico particular. Por ejemplo, se refiere al nivel de expresión de miR-199a-5p obtenido después de analizar muestras de biopsia humana (véase tabla 1 a continuación en el presente documento) o muestras de pulmón de ratón (véase tabla 2 a continuación en el presente documento) con microplacas biológicas "miARN" (Agilent technology) en sujetos sanos (de control) o sujetos que padecen fibrosis pulmonar idiopática (FPI).

20 **Tabla 1**

Sonda (ID ^a)	miARN (nombre)	Control ^b	FPI ^b	Relación ^c	P-valor ^d
A_25_P00010700	Hsa-miR-199a-5p	8,38	8,69	1,24	0,006
A_25_P00010701	Hsa-miR-199a-5p	6,31	6,69	1,30	0,005
A_25_P00010069	Hsa-miR-199a-3p	8,97	9,47	1,41	0,015
A_25_P00010068	Hsa-miR-199a-3p	7,89	8,19	1,23	0,045

^aID de Sonda de Microplaca Agilent SurePrint G3 hsa ^blog₂ de la mediana de la expresión ^cFPI frente a control ^densayo de Wilcoxon

Tabla 2

Modelo de ratón experimental	Sonda (ID ^a)	MiARN (nombre)	Control ^b	Fibrosis ^b	Relación ^c	P-valor ^d
Fibrosis pulmonar	MIMAT0000229	mmu-miR-199a-5p	3,23	4,61	2,89	4,10E-03
Fibrosis renal	MIMAT0000229	mmu-miR-199a-5p	2,61	4,52	3,71	4,12E-07
Fibrosis hepática	MIMAT0000229	mmu-miR-199a-5p	2,60	4,10	2,82	4,00E-03

^aID miRBase (<http://www.mirbase.org>) ^blog₂ de la mediana de la expresión ^cbleomicina frente a control de PBS ^densayo de Wilcoxon

25 El nivel de expresión de miARN en una célula o un tejido está determinado por la medición de los miARN presentes en dicha célula o dicho tejido. El nivel de expresión de miARN puede medirse usando cualquier técnica conocida por los expertos en la materia. Por ejemplo, después de extracción de ARN, secuenciación miARN a alta velocidad, secuenciación por NASBA (Amplificación Basada en Cadena de Ácido Nucleico), secuenciación de extensión de cebadores, microplacas de ADN de "miARN", métodos de RT-PCR cuantitativa aplicados a miARN o hibridación *in situ*.

30

El nivel de expresión de un gen diana en una célula o un tejido se determina midiendo el transcrito expresado en dicha célula o dicho tejido. El nivel de expresión de gen diana puede medirse usando cualquier técnica conocida por los expertos en la materia. Por ejemplo, se puede llevar a cabo después de extracción de ARN por RT-PCR cuantitativa, o en secciones tisulares por medio de inmunocitoquímica o inmunocitología.

5 La presente invención también se refiere a un método para identificar un sujeto susceptible de desarrollar un trastorno fibroproliferativo caracterizado por que comprende o consiste en las siguientes etapas:

- (i) medición cuantitativa del nivel de expresión de miR-199a-5p en una muestra biológica de dicho sujeto;
- 10 (ii) comparar el nivel de expresión de miR-199a-5p en dicha muestra biológica de dicho sujeto con el nivel de expresión de miR-199a-5p en una muestra biológica de referencia;
- (iii) identificar y medir en la muestra biológica de dicho sujeto el nivel de expresión de un gen diana para el que el nivel de expresión está regulado por el nivel de expresión de miR-199a-5p identificado en la etapa (ii); en el que dicho gen diana codifica caveolina-1;
- 15 (iv) comparar el nivel de expresión de caveolina-1 en dicha muestra biológica de dicho sujeto con el nivel de expresión de caveolina-1 en una muestra biológica de referencia; y,
- (v) detectar un aumento en el nivel de expresión de miR-199a-5p y una reducción en el nivel de expresión de caveolina-1.

20 La presente invención también se refiere a un inhibidor de miR-199a-5p para su uso en el tratamiento y/o la prevención de un trastorno fibroproliferativo, preferentemente fibrosis pulmonar idiopática.

La presente invención también se refiere a un inhibidor de miR-199a-5p para su uso en la estimulación de la reparación de heridas.

25 La expresión "inhibidor de miARN" de acuerdo con la presente invención se refiere a análogos de ADN u "oligómero", que consisten en una secuencia contigua de 7 a al menos 22 nucleótidos de longitud. El término "nucleótido" como se usa en el presente documento, se refiere a un glucósido que comprende un resto de azúcar, un resto de base y un grupo unido covalentemente (grupo de enlace), tal como un grupo de enlace internucleotídico fosfato o fosforotioato. Abarca tanto nucleótidos de origen natural como nucleótidos de origen no natural que comprenden restos de azúcares y/o bases modificados, que también se denominan "análogos de nucleótidos" en el presente documento. Los nucleótidos de origen no natural incluyen nucleótidos que tienen restos de azúcar, tales como nucleótidos bicíclicos o nucleótidos 2' modificados o nucleótidos 2' modificados tales como nucleótidos 2' sustituidos. Los "análogos de nucleótidos" son variantes de oligonucleótidos naturales en virtud de modificaciones en los restos de azúcar y/o base. Preferentemente, sin quedar limitado por esta explicación, los análogos tendrán un efecto funcional en la manera en que el oligómero actúa para unirse con su diana; por ejemplo produciendo afinidad de unión aumentada con la diana y/o resistencia aumentada con nucleasas y/o facilidad aumentada de transporte a la célula. Se describen ejemplos específicos de análogos de nucleósidos en Freier y Altman (Nucl. Acid Res., 25: 4429-4443, 1997) [35] y Uhlmann (Curr. Opinion in Drug Development, 3: 293-213, 2000) [36]. La incorporación de análogos potenciadores de afinidad en el oligómero, incluyendo Ácido Nucleico Bloqueado (LNATM), pueden permitir que se reduzca el tamaño del oligómero de unión específica y también pueden reducir el límite superior del tamaño del oligómero antes de que tenga lugar unión no específica o aberrante. El término "LNATM" se refiere a un análogo de nucleósido bicíclico, conocido como "Ácido Nucleico Bloqueado" (Rajwanshi *et al.*, Angew Chem. Int. Ed. Engl., 39(9): 1656-1659, 2000) [37]. Puede denominarse monómero de LNATM, o, cuando se usa en el contexto de un "oligonucleótido LNATM" a un oligonucleótido que contiene uno o más de dichos análogos bicíclicos.

Convenientemente, el oligómero de la invención es capaz de inhibir (silenciar) específicamente la actividad de miR-199a-5p ("anti-miR-199-5p") o evitar la unión de miR-199a-5p con sitios de unión de miR-199a-5p específicos en ARN diana ("Bloqueador de Sitio Diana miR-199a-5p"). Preferentemente, un "anti-miR-199a-5p" se refiere a oligonucleótidos antisentido con complementariedad de secuencia con miR-199a-5p (por ejemplo, inhibidor de miARN LNATM anti miARN-199a-5p; N.º de Producto: 426918-00, Nombre de producto: hsa-miR-199a-5p, Descripción: Inhibidor de Potencia de microARN miRCURY LNATM, EXIQON). Estos oligómeros pueden comprender o consistir en una secuencia de nucleótidos contigua de un total de 7 hasta al menos 22 nucleótidos contiguos de longitud, hasta el 70 % de análogos de nucleótidos (LNATM). El oligómero más corto (7 nucleótidos) probablemente corresponderá a un oligonucleótido antisentido con perfecta complementariedad de secuencia que coincide con los 7 primeros nucleótidos localizados en el extremo 5' de miR-199a-5p maduro, y que comprende la secuencia de 7 nucleótidos en posición 2-8 del extremo 5' denominada la secuencia "semilla" (es decir, "cagagugu" para miR-199a-5p, véase SEQ ID NO 13) implicada en la especificidad de diana de miARN (Lewis *et al.*, Cell. 14 Ene 2005 14;120(1):15-20) [38]. Un "Bloqueador de Sitio Diana de miR-199a-5p se refiere a oligonucleótidos antisentido con complementariedad de secuencia con un sitio de unión a miR-199a-5p localizado en un ARNm específico. Estos oligómeros pueden diseñarse de acuerdo con la enseñanza del documento US 20090137504. Esos oligómeros pueden comprender o consistir en una secuencia de nucleótidos contigua de un total de 8 a 23 nucleótidos contiguos de longitud. Estas secuencias pueden abarcar desde 20 nucleótidos en la dirección 5' o en la 3' de la secuencia correspondiente al complemento inverso de la secuencia "semilla" de miR-199a-5p. Por ejemplo, los "bloqueadores de sitio diana de CAV1" comprenden o consisten en una secuencia contigua de un total de 8 a 23 nucleótidos contiguos de longitud que corresponde al complemento inverso de una secuencia de nucleótidos específica presente

en el ARNm de CAV1 (NM_001753.4, NM_001172895.1, NM_001172896.1, NM_001172897.1 o variantes de origen natural de los mismos y ácidos nucleicos de ARN derivados de los mismos, preferentemente ARNm) y definida como sitio miR-199a-5p (Fig.5A: SEQ ID NO 10) La secuencia de nucleótidos de los oligómeros de la invención se unirán con alta afinidad con el sitio miR-199a-5p en ARNm de CAV1, evitando la unión de miR-199a-5p en la 3'UTR de ARNm de CAV1) en este sitio diana particular.

La presente invención también se refiere a un inhibidor de miR-199a-5p para su uso como un producto medicinal. Por ejemplo, consiste en el uso de un inhibidor de miR-199a-5p por la vía de aerosol para inhibir la fibrogénesis en el epitelio respiratorio patológico en sujetos que padecen fibrosis pulmonar y de este modo restaurar la integridad del tejido patológico para restaurar la funcionalidad completa.

De acuerdo con una realización particular de la invención, se pretende que dicho producto medicinal prevenga y/o trate un trastorno fibroproliferativo, preferentemente fibrosis pulmonar idiopática.

Los ejemplos de realizaciones de la presente invención en lo sucesivo en el presente documento, junto con las figuras adjuntas, ilustran la invención y se proporcionan como ejemplos no limitantes.

Breve descripción de las Figuras

- La Figura 1 representa la expresión de miR-199a-5p durante fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (A) Agrupamiento jerárquico (o árbol) que representa expresión de miARN modulada de forma estadísticamente significativa diferencial (el valor ajustado $<0,05$) en los pulmones de ratones BALB/c y C57BL/6 en respuesta a bleomicina en los puntos temporales indicados. Se muestran miARN regulados positivamente en tonos de rojo progresivamente más brillantes, y se muestran miARN regulados negativamente en tonos de verde progresivamente más brillantes basándose en el valor de \log_2 del mismo (Bleomicina/PBS). Se muestra MiR-199a-5p con una flecha. N=3 ratones en cada grupo. (B) MiR-199a-5p en los pulmones de ratones BALB/c y C57BL/6 en respuesta a bleomicina en los tiempos especificados. N=3 ratones en cada grupo. Los datos se expresan como la media \pm error típico de la media. $**p<0,01$. (C) Secciones de parafina preparadas de ratones C57BL/6 recogidas 14 días después de la instilación de bleomicina intratraqueal. Se llevaron a cabo ensayos de hibridación *in situ* e inmunohistoquímica para determinar la colocalización de miR-199a-5p y α -SMA. Los resultados representan uno de tres ensayos realizados independientemente.
- La Figura 2 representa la expresión de miR-199a-5p y pri-miR-199a en ratones C57BL/6 14 días después de exposición a bleomicina (A) PCR en tiempo real realizada para confirmar el aumento de la expresión de miR-199a-5p maduro en los pulmones de ratones C57BL/6 y BALB/c 14 días después de administrar bleomicina; n=5 ratones en cada grupo, los datos se expresan como la media \pm el error típico de la media. $*p<0,05$ (B) Expresión de genes de pri-miR-199a-1 y pri-miR-199a-2 en los pulmones de ratones C57BL/6 14 días después de la instalación de bleomicina. N=5 ratones en cada grupo, los datos se expresan como la media \pm el error típico de la media. $*P<0,05$ y $**p<0,01$.
- La Figura 3 representa la identificación de dianas candidatas en el miR-199a-5p usando un enfoque transcriptómico. Se transfectaron fibroblastos de pulmón humano hFL1 normales con pre-miR-Neg, pre-miR-199-5p o pre-miR21 (n=2). Se recogieron muestras de ARN 48 horas después de la transfección y los perfiles de expresión se determinaron con microplacas genómicas (A) Árbol jerárquico que compara el \log_2 normalizado de las relaciones entre la señal en las diversas condiciones y la señal pre-miR-neg (B) sobreexpresión de dianas predichas específicas en el conjunto de transcritos regulados negativamente después de transfección con miR-199a-5p y miR-21. La representación de las dianas de miARN predichas en el conjunto de genes regulados negativamente se comparó con el conjunto de todos los genes expresados usando la herramienta miRonTop: <http://www.microarray.fr:8080/miRonTop/index>. Las gráficas muestran el alcance del enriquecimiento, representado en la forma de $-\log_{10}$ (p valor ajustado), basándose en el nivel de enriquecimiento usando tres herramientas de predicción diferentes para todos los miARN conocidos: miR-199a-5p y miR-21 se representan como \diamond y Δ , respectivamente. Los valores umbral usados para definir el conjunto de genes regulados positivamente y regulados negativamente: $\text{ExpProm}=7,0$; $\log \text{FC}=0,7$; p valor ajustado=0,05. (C) Diagrama de Venn que compara el número de dianas de miR-199a-5p entre el conjunto de genes regulados negativamente de forma significativa después de transfección de pre-miR-199a-5p basada en tres herramientas de predicción separadas (targetScan, Pictar y miRanda). Los umbrales de selección son iguales a 7,0 para \log_2 (señal), -1,5 para \log_2 (relación) y 0,01 para el p valor ajustado.
- La Figura 4 representa la lista de temas correspondientes a las anotaciones de la "ruta canónica" identificadas por software de Análisis de Ruta Ingenuity en respuesta a sobreexpresión de miR-199a-5p y miR-21 en fibroblastos de pulmón humano hFL1. Se transfectaron fibroblastos de pulmón humano hFL1 con pre-miR-Neg, pre-miR-199a-5p o pre-miR-21 (n=2). Se recogieron muestras de ARN 48 horas después de la transfección y se determinaron los perfiles de expresión con microplacas biológicas de genoma completo. La probabilidad de obtener el número de genes en una ruta específica en la lista de genes expresados diferencialmente entre miR-199a-5p o miR-21 frente a miR-Neg se comparó con la misma representación de la misma ruta entre todos los genes en la microplaca biológica; se muestra $-\log_{10}$ de la probabilidad exacta de Fisher. Mientras que las identificaciones tanto de miR-199a-5p como de miR-21 se asociaron con "señalización de TGF β ", varias identificaciones se asociaron específicamente con miR-199a-5p, incluyendo "señalización de integrina" y "señalización de endocitosis mediada por caveolas".

- La Figura 5 representa CAV1 como la diana directa de miR-199a-5p. (A) La cotransfección de pre-miR-199a-5p o pre-miR-Neg y construcción de psiCHECK™-2 derivada de 3'UTR CAV1 humana (tipo silvestre o mutada en la región semilla miR-199a-5p potencial) en células HEK293 demuestra una reducción significativa en la actividad luciferasa normalizada 48 horas después de la transfección para la construcción de tipo silvestre solamente. *p<0,05. Se muestra la posición del sitio diana de miR-199a-5p en 3'UTR de CAV1 y el alineamiento de secuencias de miR-199a-5p y 3'UTR de CAV1 usando diversas especies. La representación se limita a la región alrededor del sitio de complementariedad de miR-199a-5p. El sitio de unión a miR-199a-5p retenido en 3'UTR de CAV1 se muestra en negrita. (B) Expresión de CAV1 relativa determinada por PCR en tiempo real en fibroblastos de pulmón hFL1 después de transfección con pre-miR-199a-5p, pre-miR-21 o ip-CAV1. Los datos representan tres ensayos independientes. Los datos se expresan como la medida ± el error típico de la media. *P<0,01 (C) Valores de expresión de fluorescencia normalizados de CAV1 en fibroblastos de pulmón hFL1 después de transfección con pre-miR-199a-5p, pre-miR-21 o siCAV1 basados en ensayos de microplaca biológica. Los datos representan dos ensayos independientes. Los datos se expresan como la media ± el error típico de la media. *P<0,01 (D) Análisis de transferencia de Western que demuestra la regulación negativa de expresión de la proteína CAV1 después de transfección de fibroblastos de pulmón hFL1 con pre-miR-199a-5p, pre-miR-21 o siCAV1. Se muestra un ensayo representativo de dos.
- La Figura 6 representa la reducción de la expresión de CAV1 después de transfección de fibroblastos de pulmón MRC-5 con pre-miR-199a-5p. (A) Fibroblastos de pulmón MRC-5 transfectados con 10 nM de pre-miR-199a-5p durante 24 horas presentan una reducción significativa de la expresión de CAV1 como se determina por medio de PCR en tiempo real. Los datos se expresan como la media ± el error típico de la media. **p <0,01. (B) Análisis de transferencia de Western que demuestra la reducción de la expresión de CAV1 después de transfección de fibroblastos de pulmón MRC-5 con pre-miR-199a-5p. Los datos representan dos ensayos independientes.
- La Figura 7 representa la regulación de la expresión de CAV1 y miR-199a-5p con TGFβ. Se trataron fibroblastos de pulmón MRC-5 con 10 ng/ml de TGFβ durante 24 horas y 48 horas. Los niveles de expresión de miR-199a-5p (A) y CAV1 (B) se determinaron por PCR Taqman. Los datos se expresan como la media ± el error típico de la media. *P<0,01. (C) Los niveles de proteínas CAV1 se determinaron por análisis de inmunotransferencia. (D) Se transfectaron células MRC5 con LNA-miR-199a-5p, un bloqueador de sitio diana de LNA de CAV1 (protector de CAV1) o control de LNA, se incubaron después con o sin TGFβ 10 ng/ml durante 24 horas y se determinaron los niveles de proteína CAV1 por análisis de inmunotransferencia. Los datos representan tres ensayos independientes.
- La Figura 8 representa la expresión de CAV1 alterada en un modelo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina de ratón. (A) El análisis de microplaca biológica demuestra una reducción significativa en la expresión de CAV1 en ratones C57BL/6 tratados con bleomicina durante 14 días (n=5) en comparación con los ratones de control (n=5). Los datos se expresan en forma de valores de fluorescencia normalizados ± el error típico de la media. *P<0,01 (B) PCR en tiempo real realizada para confirmar la reducción en la expresión de CAV1 en los pulmones de ratones C57BL/6 14 días después de la administración de bleomicina. N=5 ratones en cada grupo. Los datos se expresan como la media ± el error típico de la meda. *P<0,05 (C) Expresión de CAV1 como se detecta por análisis de inmunotransferencia en muestras de tejido pulmonar de ratones C57BL/6 tratados con bleomicina durante 14 días (n=3) y ratones de control (n=3) (D) Análisis inmunohistoquímico de expresión de CAV1 en secciones del tejido pulmonar de ratones C57BL/6 14 días después de la instilación de bleomicina intratraqueal. Se muestra una sección representativa de tres.
- La Figura 9 representa expresión de CAV1 pulmonar en ratones BALB/c "resistentes a fibrosis pulmonar" 14 días después de inyectar bleomicina. Se realizó PCR en tiempo real para evaluar la expresión de CAV1 en los pulmones de ratones BALB/c 14 días después de exposición a bleomicina. n=5 ratones en cada grupo, los datos se expresan como la media ± el error típico de la media. n.s. = no significativo.
- La Figura 10 representa la lista de los 133 genes modulados por miR-199a-5p en fibroblastos de pulmón que también están desregulados en los pulmones de ratones C57BL/6 14 días después del tratamiento de bleomicina [Intensidad promedio: log2 de la intensidad promedio; Relación Log: log2 (Bleo/PBS); PValor: p valor ajustado para un gran número de acontecimientos de acuerdo con el ensayo corregido de Benjamini Hochberg]. Tanto CAV1 como CAV2 están regulados negativamente de forma significativa en los 2 modelos.
- La Figura 11 representa la desregulación de miR-199a-5p y la diana de CAV1 del mismo en FPI. (A y B) Representaciones en cajas que muestran la expresión normalizada de CAV1 transformada por log2 y miR-199a-5p en pulmones con FPI (n=94) y de control (n=83). La caja representa los cuartiles 25-75 %, la línea en la caja representa la mediana y los bigotes representan el intervalo. (**p<0,001) (C) Análisis inmunohistoquímico de la expresión de CAV1 en secciones de tejido pulmonar de pacientes que padecen FPI. Se muestra una sección representativa (D) hibridación *in situ* que demuestra expresión de miR-199a-5p (i) o una sonda de control (ii) en secciones de tejido pulmonar de pacientes que padecen FPI.
- La Figura 12 representa la influencia funcional de miR-199a-5p en fibroblastos pulmonares. El aumento de la expresión de miR-199a-5p en los fibroblastos del pulmón da como resultado un aumento de la capacidad de los fibroblastos para migrar, proliferar, invadir matrigel y diferenciarse en miofibroblastos. (A y B) Ensayo de curación *in vitro* realizado para evaluar la velocidad de migración de fibroblastos de pulmón transfectados con 10 nM de miR-199a-5p o control 0, 6,5 y 9,5 horas después de la lesión por araño. Se observó un aumento significativo (p<0,01) en la velocidad de migración en fibroblastos de pulmón transfectados con miR-199a-5p en comparación con el control. Los datos representan dos ensayos independientes. (C) Ensayo de invasión en matrigel que muestra que la sobreexpresión de miR-199a-5p aumenta la invasividad de fibroblastos de pulmón MRC5. Los datos son representativos de dos experimentos independientes (D) Efectos de miR-199a-5p en la proliferación de

- fibroblastos de pulmón determinados por análisis de citometría de flujo bivalente de células teñidas con EdU/ADN. El eje x representa la intensidad lineal obtenida usando yoduro de propidio (contenido de ADN total) y el eje y representa la intensidad logarítmica obtenida usando Alexa Fluor647. Las células se separaron en fase G0/G1 y fase G2/M basándose en el contenido de ADN de las mismas, y en subgrupos no dividido marcado y dividido marcado basándose en el contenido de ADN de las células marcadas con EdU. Se muestra un ensayo representativo de tres. (E) La microscopia confocal de células MRC5 que sobreexpresan miR-199a-5p reveló que el aumento de los niveles de miR-199a-5p en fibroblastos de pulmón promueve su diferenciación en miofibroblastos. Las células se tiñeron con un anticuerpo contra α -SMA (verde) y faloidina (rojo). Los experimentos se realizaron dos veces. (F) Se evaluó la expresión relativa de COL1A1 por PCR Taqman en células MRC5 que sobreexpresaban miR-199a-5p y expuestas o no a TGF β . Los datos se expresan como la media \pm ETM y derivan de 2 experimentos independientes. * $p < 0,05$.
- La Figura 13 representa la comparación de cambios de transcriptoma inducidos por miR-199a-5p y ARNip dirigidos contra CAV1. Se transfectaron fibroblastos de pulmón humano hFL1 normales con pre-miR-Neg, pre-miR-199a-5p y con ipCAV1 o ARNip de control (n=2). Se recogieron muestras de ARN 48 horas después de la transfección y se determinaron los perfiles de expresión con un conjunto de microplacas biológicas genómicas. (A) Árbol de decisión que compara el log2 normalizado de las relaciones entre las señales de pre-miR-199a-5p frente a pre-miR-Neg o las señales de ipCAV1 frente a ip-Neg (B) diagrama de Venn que compara el conjunto de transcritos regulados negativamente después de la inducción con miR-199a-5p e ipCAV1. Los umbrales de selección son iguales a 7,0 para log2 (señal), 0,7 para log2 (relación) y 0,05 para el p valor ajustado.
 - La Figura 14 representa miR-199a-5p como un efector de la ruta de TGF β . (A) Árbol de decisión de las rutas canónicas significativas asociadas con contextos de sobreexpresión de miR-199a-5p, miR-21 o ipCAV1 identificados usando el software Ingenuity Pathway Analysis™. (B) Gráficos de GSEA para una identificación de TGF β experimental que muestran un enriquecimiento significativo para genes regulados positivamente y regulados negativamente por miR-199a-5p. Los datos se procesaron usando software GSEA, con transcritos ordenados basándose en los contextos de miR-199a-5p frente a miR-Neg medidos usando la desviación típica de los mismos. Los genes regulados positivamente y regulados negativamente se manipularon por separado con respecto a una identificación de TGF β experimental obtenida en los mismos modelos celulares (fibroblastos de hFL1 tratados con 10 ng/ml de TGF β 1 durante 48 horas): se seleccionaron dos conjuntos de 134 y 113 genes correspondientes a conjuntos de genes regulados positivamente y regulados negativamente por TGF β como se describe en el Ejemplo 1 ($p < 0,05$). En cada caso, los gráficos muestran enriquecimiento, la puntuación pico correspondiente al ET y la posición del conjunto de genes de TGF β en la lista de genes clasificados (cada transcrito se muestra con una línea vertical). (C) Células MRC5 transfectadas con LNA-miR-199a-5p, Bloqueador de Sitio Diana de CAV1 (protector de CAV1) de control de LNA, después incubadas con o sin TGF β 10 ng/ml durante 24 horas y células teñidas con un anticuerpo contra α -SMA (verde), faloidina (rojo) y DAPI (azul). Los experimentos se realizaron dos veces. (D) Células cotransfectadas con plásmido indicador de luciferasa SMAD, actividades de luciferasa analizadas 48 horas después de la transfección. Todas las actividades de luciferasa de luciérnaga se normalizaron con actividad de luciferasa de renilla. * $p < 0,05$. Dos experimentos independientes. (E) y (F) Ensayo de curación *in vitro* (o araño) realizado para evaluar la velocidad de migración de fibroblastos de pulmón hFL1 estimulados con TGF β tratados con 25 nM de LNA anti miR-199a-5p, inhibidor de control del LNA y protector de CAV1. Se observó una reducción significativa ($p < 0,01$) en la velocidad de migración en fibroblastos de pulmón transfectados con LNA anti miR-199a-5p y protector de CAV1 en comparación con el control. Los datos representan dos ensayos independientes.
 - La Figura 15 representa la comparación del cambio de expresión génica entre genes regulados por miR-199a-5p en fibroblastos de pulmón y pulmones de ratones C57BL/6 14 días después de inyectar bleomicina. (A) Diagrama de Venn que muestra las correlaciones de los cambios en la expresión génica entre fibroblastos de pulmón transfectados con miR-199a-5p (dos ensayos independientes) y los pulmones de ratones C57BL/6 14 días después del tratamiento con bleomicina (n=5 ratones). Se muestran los números de genes para los que se detectó expresión diferencialmente en cada condición a $p < 0,05$. El análisis de microplaca biológica demuestra una reducción significativa en la expresión de CAV1 (B), TGFBR1 (C), CCL2 (D), ACTA2 (E) y MMP3 (F) en ratones C57BL/6 tratados con bleomicina durante 14 días (n=5) en comparación con ratones de control (n=5). Los datos se expresan como la media \pm el error típico de la media. ** $p < 0,01$.
 - La Figura 16 representa los genes profibróticos modulados significativamente en fibroblastos de pulmón por miR-199a-5p independientemente de la regulación de CAV1. Se transfectaron fibroblastos de pulmón con miR-199a-5p, ipCAV1 o controles negativos. El análisis de microplaca biológica muestra la expresión de genes fibróticos conocidos: CAV1 (A), TGFBR1 (B), MMP3 (C), PLAU (D) y CCL2 (E) 48 horas después de la transfección. Los datos se expresan como la media \pm el error típico de la media.
 - La Figura 17 representa la desregulación de miR-199a-5p en tres modelos de fibrosis hepática, pulmonar y renal de ratón experimentales. Los diagramas de Venn que muestran las correlaciones de cambios de la expresión de miARN en pulmones de ratones C57BL/6 14 días después del tratamiento con bleomicina (n=4 ratones), hígados de ratones BALB/c 6 semanas después de administrar CCl₄ (n=5 ratones) y riñones de ratones C57BL/6 28 días después de obstrucción ureteral unilateral (n=4 ratones). Se muestra el número de miARN para los que se detectó expresión diferencialmente en cada modelo de ratón a $p < 0,01$. Los datos de la fibrosis hepática se toman de [24].
 - La Figura 18 representa expresión potenciada de miR-199a-5p en muestras clínicas de pacientes con fibrosis hepática. Se realizó ensayo de hibridación *in situ* para determinar la localización de miR-199a-5p en hígados humanos normales y fibróticos. Los resultados representan uno de tres experimentos independientes.

- 5 - La Figura 19 representa la alteración de la expresión de miR-199a-5p en un modelo de fibrosis hepática inducida por CCl₄ de ratón. (A) Expresión de miR-199a-5p en los hígados de ratones BALB/c tratados con aceite o CCl₄ durante 6 semanas analizados por qPCR; n=5 por grupo. Los datos se expresan como la media ± el error típico de la media. **p<0,01. (B) Expresión de miR-199a-5p en los hígados de ratones C57BL/6 tratados con aceite o CCl₄ durante 6 semanas analizados por qPCR; n=5 por grupo. Los datos se expresan como la media ± el error típico de la media. *p<0,05. (C) Expresión de miR-199a-5p en los hígados de ratones C57BL/6 21 días después del ligamiento del conducto biliar o el procedimiento de control analizado por qPCR; n=4 ratones por grupo. Los datos se expresan como la media ± el error típico de la media. **p<0,05. (D) Expresión de miR-199a-5p en el hígado de ratones C57BL/6 durante la regresión de fibrosis. Se indujo fibrosis hepática inyectando CCl₄ y se evaluó la expresión de miR-199a-5p 6 semanas después del tratamiento con CCl₄ y 2 y 4 semanas después de la inyección final. Los datos se expresan como la media ± el error típico de la media. **p<0,05. (E) Expresión de miR-199a-5p y CAV1 en células estrelladas primarias aisladas de ratones C57BL/6 y estimuladas con 20 ng/ml de TGFβ durante 48 horas.
- 10 - La Figura 20 representa la alteración de la expresión de miR-199a-5p y CAV1 en un modelo de fibrosis renal de obstrucción uretral unilateral (OUU) de ratón. (A) Expresión de miR-199a-5p en el riñón de ratones C57BL/6 después de OUU en los puntos temporales indicados. n=5 a 7 ratones en cada grupo. Los datos se expresan como la media ± el error típico de la media. **p<0,01. (B) Secciones de parafina preparadas a partir de riñones de ratones C57BL/6 recogidos 28 días después de OUU. El ensayo de hibridación *in situ* se realizó para determinar la localización de miR-199a-5p en el riñón. Los resultados representan uno de tres ensayos independientes. (C) Análisis inmunohistoquímico de expresión de CAV1 en secciones tisulares de riñón de ratones C57BL/6 28 días después de OUU. Se muestra una sección representativa de dos.

Ejemplos

25 Ejemplo 1: materiales y métodos

Líneas celulares, reactivos y anticuerpos

30 Se adquirieron fibroblastos de pulmón humano normales MRC-5 y hFL1 5CCL-153 y la línea celular de cáncer de pulmón humano A549 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.) y se cultivaron en medio DMEM que contenía suero de ternero fetal al 10 %, a 37 °C con CO₂ 5 % v/v.

Se adquirió TGFβ recombinante de Sigma-Aldrich.

35 Los siguientes anticuerpos monoclonales y policlonales se usaron para los análisis de inmunohistoquímica y transferencia de Western: anticuerpo policlonal de conejo anti CAV1 (sc-894, Santa Cruz Biotechnology Inc.), anticuerpo monoclonal de conejo anti β actina (13E5, señalización celular), anticuerpo monoclonal de ratón anti α-SMA (1A4, Dako).

40 Modelos experimentales de fibrosis pulmonar, renal y hepática

Modelo de fibrosis pulmonar de ratón

45 Se adquirieron ratones macho de cepa C57BL/6 y BALB/c, de 9 a 12 semanas de edad, de Charles River, Francia. Para inducir los cambios fibróticos, los ratones se instilaron por vía intratraqueal con bleomicina o PBS para los controles. Para este fin, los ratones se anestesiaron mediante inhalación de sevorano (Abbott) y se colocaron en la posición supina. Se usó una inserción transtraqueal de una aguja de aporte de 24-G para instilar bleomicina (0,75 unidades/ml) o excipiente (PBS) en un volumen de 80 ml. Los ratones se sacrificaron 7 y 14 días después de la instilación y los pulmones se retiraron para análisis posterior.

Modelo de fibrosis renal de ratón

55 Se adquirieron ratones macho de cepa C57BL/6 y BALB/c, de 9 a 12 semanas de edad, de Charles River, Francia. Los ratones se anestesiaron por medio de inyección intraperitoneal de pentobarbital (50 mg/kg de peso corporal). Después de laparotomía convencional, se expuso el uréter próximo izquierdo y se ligó en dos puntos con seda 4-0. El procedimiento de "simulación o control" consistió en una identificación similar del uréter izquierdo, pero el uréter no se ligó.

Modelo de fibrosis hepática de ratón

60 Se adquirieron ratones macho de cepa C57BL/6 y BALB/c, de 6 a 8 semanas de edad de Jackson Laboratory (Bar Harbor). Para inducir fibrosis hepática, los ratones recibieron 0,6 ml/kg de peso corporal de CCl₄ (Merck) mezclado con aceite de maíz (Sigma Life Science) por la vía intraperitoneal como se ha descrito anteriormente [Roderbrug *et al.*, *Hepatol.*, 53: 209-218, 2011] [24]. El conducto biliar se ligó exponiendo el conducto hepático común y realizando un doble ligamiento del mismo, y posteriormente cortando entre los ligamientos como se describe en Roderbrug *et al.* [2011, citado anteriormente] [24]. Para inducir regresión por fibrosis, los ratones se trataron durante 6 semanas

con CCl₄ como se ha descrito anteriormente y se sacrificaron 2 o 4 semanas, respectivamente, después del final del tratamiento.

Aislamiento de células estrelladas primarias

5 Se aislaron células estrelladas primarias de ratones C57BL/6 de 40-55 semanas de edad y se estimularon con 20 ng/ml de TGF-β1 (Sigma Aldrich) durante 48 horas como se ha descrito previamente en Roderburg *et al.* [2011, citado anteriormente] [24].

10 Tejido de pulmón humano

Se obtuvieron tejidos de pulmón congelados de sujetos con FPI y sin enfermedad pulmonar crónica del “Consortio de Investigación de Tejido Pulmonar (LTRC)”. Los diagnósticos se basaron en las directrices de ATS/ERS [Demedts y Costabel, *Eur. Respir. J.*, 19: 794-796, 2002; Steele *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 172: 1146-1152, 2005] [32, 33] basándose en el historial clínico, la patología y la radiología. Todos los ensayos fueron aprobados por el Comité de Revisión Institucional Local en la Universidad de Pittsburgh. Los datos clínicos se pusieron totalmente a disposición de los investigadores para su examinación.

Se obtuvieron secciones de pulmón tratadas con parafina de pacientes con FPI del hospital de Lille. Los ensayos fueron aprobados por la comisión de investigación institucional del hospital de Lille.

Histopatología

Se fijaron riñones y pulmones de ratones durante una noche con formalina tamponada neutra y después se incluyeron en parafina. Se montaron secciones tisulares de 5 μm de grosor y se tiñeron con hematoxilina y eosina y con tricrómica de Masson para evaluar el grado de fibrosis. Las secciones histológicas fueron examinadas por un patólogo experimentado.

Extracción de ARN total y control de calidad

Se extrajo el ARN total de muestras celulares y tisulares de pulmón usando reactivo de Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La pureza y concentración de las muestras de ARN totales se evaluaron en primer lugar usando el espectrofotómetro Nanodrop. Se compararon las relaciones 260/280 y 260/230 y deberían tener un valor cercano a 2. Después se cargó el ARN en una nanoplaca chi y se analizó la calidad de la misma (nivel de integridad y degradación de ARN) usando el Bioanalyzer System (Agilent Technologies, Francia).

Microplacas biológicas

Microplacas biológicas de miARN de pulmón de ratón

Las secuencias oligonucleotídicas correspondientes a 2054 miARN maduros hallados en el registro de miARN están disponibles en <http://www.microarray.fr:8080/merge/index> (seguir el enlace a “microARN”: referencias de plataforma en la base de datos GEO del NCBI en GPL4718). Se produjeron tres reproducciones biológicas para cada comparación. Los datos experimentales y el diseño de microplaca biológica se registraron en la base de datos GEO de NCBI GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) con el número de serie GSE34812. El diseño experimental usó un enfoque de “intercambio de colorante” de modo que cada sonda de ratón, impresa 8 veces en la microplaca biológica se midió 16 veces independientemente para cada muestra. La preparación diana y la hibridación de microplaca biológica se llevaron a cabo como se ha descrito previamente [Pottier *et al.*, *PLoS. One*, 4: e6718, 2009; Triboulet *et al.*, *Science*, 315: 1579-1582, 2007; Puisségur *et al.*, 2011, citado anteriormente] [25, 26, 13].

Análisis de microplaca biológica de miARN de pulmón humano

Se realizó análisis de microplaca biológica de miARN como se ha descrito previamente [Pandit *et al.*, 2010, citado anteriormente] [18]. Brevemente, se marcaron 100 ng de ARN total y se hibridaron en micromatriz de microARN Agilent versión 16.0, 8x60 K. Después de lavar, la microplacas se exploraron usando un explorador de micromatrices Agilent. Las imágenes exploradas se procesaron con el software de extracción de elementos de Agilent versión 9.5.3. Los datos de microplaca biológica de miARN se analizaron usando GeneSpring v11.5 y BRB-ArrayTools v.1 desarrollado por el Dr. Richard Simon y el equipo de desarrollo de BRB-ArrayTools. Los datos se normalizaron por cuantiles. Los datos de microplaca biológica de miARN están disponibles al público mediante el sitio web del consorcio de investigación de genómica de pulmón (LGRC) (lung-genomics.org).

Microplacas biológicas de expresión

Las muestras de ARN se marcaron con tinción de Cy3 usando el kit de introducción de ARN bajo QuickAmp (Agilent) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se hibridaron 825 ng de ARNc marcado en ratón o microplacas biológicas de expresión génica SurePrint G3 de alta densidad Agilent 8x60 K. Se produjeron dos (ensayos humanos *in vitro*) o cinco (muestras derivadas *in vivo*) reproducciones biológicas para cada comparación. Los datos experimentales se registraron en la base de datos GEO de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) en la superserie GSE34818 (series GSE34812 y GSE34814 para las respuestas de miARN y ARNm en el modelo de bleomicina de ratón, respectivamente; serie GSE34815 para los ensayos de transfección de miARN/ARNip en fibroblastos humanos hFL1). Para las microplacas de expresión génica humana, los datos se convirtieron en log₂ y se normalizaron usando un algoritmo cíclico de Loess en el ambiente de programación R como se ha descrito previamente [Wu *et al.*, BMC. Bioinformatics, 6: 309, 2005] [34]. Los datos de microplacas biológicas humanas se han puesto a disposición del público en el LTRC (ltrcpub-lic.org) y sitios web del LGRC como parte del protocolo de LTRC.

Análisis estadístico y análisis temático biológico

Se llevó a cabo la normalización usando el programa Limma disponible de Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>). La normalización dentro de la placa (solamente ensayos de cambio de colorante de dos colores) y entre placas se llevó a cabo usando el método de "PrintTip Loes" y el método de cuantiles, respectivamente. Las relaciones medias de todas las comparaciones se calcularon y se realizó un análisis de ensayo B. Se seleccionaron genes expresados diferencialmente usando la corrección de p valor Benjamini-Hochberg para múltiples ensayos, basándose en un p valor de menos de 0,05. Los datos de microplaca biológica de expresión se analizaron con respecto a enriquecimiento de tema biológico (rutas canónicas y función molecular de ontología genética) y para construir redes biológicas usando software de análisis de rutas Ingenuity (<http://www.ingenuity.com/>) y Mediante (<http://www.microarray.fr:8080/merge/index>) [Le y Barbry, Bioinformatics, 23: 1304-1306, 2007] [27], un sistema de información que contiene diversas informaciones sobre sondas y conjuntos de datos. Se usó software de análisis de enriquecimiento de conjunto génico (GSEA) para determinar si un conjunto génico definido en principio puede caracterizar diferencias entre dos estados biológicos [Subramanian *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 102: 15545-15550, 2005] [28]. Se produjeron grupos jerárquicos con MultiExperiment Viewer (MeV) versión 4.3, usando la distancia de Manhattan y el enlace medio.

Análisis de diana de miARN

MiRonTop [Le *et al.*, Bioinformatics, 26: 3131-3132, 2010] [29] es una herramienta en red Java en línea (disponible en <http://www.microarray.fr:8080/miRonTop/index>) que integra datos de microplaca biológica de ADN para identificar la implicación potencial de miARN en un sistema biológico específico. Brevemente, MiRonTop clasifica los transcritos en dos categorías ("regulados positivamente" y "regulados negativamente"), basándose en el nivel de expresión y los umbrales de expresión diferencial. Calcula después el número de dianas predichas para cada miARN, basándose en el software de predicción seleccionado (Targetscan, MiRBase, PicTar, búsqueda de descendencia exacta: 2-7 o 1-8 primeros nucleótidos de miARN, TarBase v1), en cada conjunto génico. Después se ensaya el enriquecimiento de diana de miARN en cada categoría usando la función hipergeométrica. La ausencia de un efecto de diana distinto de ARNip se verificó en ensayos de transcriptoma de ip-CAV1 usando la herramienta Sylamer [Van *et al.*, Nat. Methods, 5: 1023-1025, 2008] [30].

Ensayos de transfección y luciferasa

Pre-miARN, inhibidores de miARN basados en LNA, bloqueador de sitio diana y transfección de ARNip en fibroblastos de pulmón

Se adquirieron pre-miR-199-5p, pre-miR-21 y miARN de control (miR-Neg n.º 1) de Ambion. Para los ensayos de atenuación de miR-199-5p, se pidieron LNA anti miR-199-5p y el control negativo de LNA anti miR-159s (sonda de atenuación de LNA miRCURY) de Exiqon. Se adquirieron ARNip dirigido contra CAV1 y ARNip de control (ARNip validados por Silencer Select) de Applied Biosystems.

Se cultivaron células MRC5/hFL1 en medio DMEM que contenía FCS 10 % y se transfectaron hasta 30-40 % de confluencia en placas de 6 o 12 pocillos usando Lipofectamine RNAi MAX™ (Invitrogen) con pre-miARN, ARNip o inhibidores de LNA a una concentración final de 10 nM a no ser que se indique.

Cotransfección de construcción de plásmido psiCHECK™-2 y pre-miARN

Se produjeron construcciones moleculares en vector pSI-CHECK™-2 (Promega) clonando detrás de luciferasa de Renilla en los sitios de restricción XhoI y NotI, oligonucleótidos híbridos derivados de 3'UTR de CAV1 descritos en lo sucesivo en el presente documento. Se cultivaron células HEK293 en medio DMEM que contenía FCS 10 % hasta su confluencia. Las células se distribuyeron después a placas de 96 pocillos y se cotransfectaron usando lipofectamine 2000™ (Invitrogen) con 0,2 µg de construcción plasmídica psiCHECK™-2 o pre-miR-199-5p o miARN

de control a una concentración final de 10, 30 y 50 nM. 48 horas después de la transfección, se evaluaron las actividades luciferasa de renilla y luciérnaga con el kit de sistema de ensayo de luciferasa Dual Glo (Promega) y se midieron usando un luminómetro (Luminoskan Ascent, ThermoLab system).

5 hsa-CAV1: WT (sentido):
TCGAGGACACTTTAATTACCAACCTGTTACCTACTTTGACTTTTTGCATT
TAAAACAGAGACTGGCATGGATATAGTTTTACTTTTAACTGTGTACGC (SEQ ID NO: 1)

10 hsa-CAV1: WT (antisentido):
GGCCGCGTACACAGTTTTAAAAGTAAAAGTATATCCATGCCAGTGTCTGTT
TTAAATGCAAAAAGTCAAAGTAGGTAACAGGTTGGTAATTAAGTGTCC (SEQ ID NO: 2)

15 hsa-CAV1: MUT (sentido):
TCGAGGACACTTTAATTACCAACCTGTTACCTACTTTGACTTTTTGCATT
TAAAACAGAGAGTCGCATGGATATAGTTTTACTTTTAACTGTGTACGC (SEQ ID NO: 3)

20 hsa-CAV1: MUT (antisentido):
GGCCGCGTACACAGTTTTAAAAGTAAAAGTATATCCATGCCAGTGTCTGTT
TTAAATGCAAAAAGTCAAAGTAGGTAACAGGTTGGTAATTAAGTGTCC (SEQ ID NO: 4)

Ensayo marcado por SMAD

25 Se sembraron células MRC5 en placas de 96 pocillos y se cotransfectaron 24 h después a 4 % de confluencia usando reactivo de lipofectamine RNAi MAX con 100 ng de vector indicador SMAD (Signal Smad Reporter, Qiagen) y LNA-control 10 nM, LNA-199a-5p o protector de CAV1. 24 h después de la transfección, las células se privaron de suero 3 h antes de añadir TGFβ 10 ng/ml. Las células se lisaron y se realizó ensayo de luciferasa Glo (Promega) 24 h después de exposición a TGFβ.

30 RT-PCR cuantitativa

Expresión de miARN madura

35 La expresión de miR-199a-5p se evaluó usando el kit de ensayo de microARN TaqMan (Applied Biosystems) como se especifica en el protocolo. Se realizó PCR en tiempo real usando el producto de mezcla maestra de PCR GeneAmp Fast (Applied Biosystems) y la máquina de PCR en tiempo real ABI 7900HT. Los niveles de expresión de miARN maduro se evaluaron usando el método de CT comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

Expresión de pri-miARN

40 Se evaluaron las expresiones de pri-miR-199a-1 y pri-miR-199a-2 usando el sistema de ensayo de pri-microARN TaqMan (Applied Biosystems) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se realizó PCR en tiempo real usando el producto de mezcla maestra de expresión génica TaqMan™ (Applied Biosystems) y la máquina de PCR en tiempo real ABI 7900HT. Los niveles de expresión de pri-miARN se evaluaron usando el método de CT comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

Expresión genética

50 Se analizaron los niveles de expresión de CAV1 humano y de ratón usando el sistema de ensayo de microARN TaqMan (Applied Biosystems) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Se realizó PCR en tiempo real usando el producto de mezcla maestra de expresión génica TaqMan™ (Applied Biosystems) y la máquina de PCR en tiempo real ABI 7900HT. Se evaluaron los niveles de CAV1 usando el método de CT comparativo ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

Extracción de proteína e inmunotransferencia

55 Las células o los tejidos se lisaron en un tampón de lisis (tampón de extracción de proteínas M-PER para células, reactivo de extracción de proteínas T-PER para tejidos) y una mezcla de inhibidores de proteasa (Pierce). Los lisados se ensayaron respecto a concentraciones de proteínas usando el ensayo de Bradford (Biorad). Las proteínas (10 µg por muestra) experimentaron electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y se transfirieron a medio líquido en una membrana de nitrocelulosa (Hybond™ C Extra, Amersham Bioscience) durante una hora y media en un tampón de transferencia (base Tris 50 mM, glicina 40 mM, SDS 1,3 mM y etanol 10 %). Después de la transferencia, la membrana se bloqueó en una solución de leche 5 % TBS-Tween 0,1 % durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Después se incubó con anticuerpos primarios anti CAV1 (Santa Cruz) diluidos hasta 1:400, anticuerpos anti beta actina (Cell Signaling Technology) hasta 1:1.000 durante una noche a 4 °C en una placa giratoria. Después de lavar 3 veces en TBS-Tween 0,1 % durante 30 minutos a temperatura ambiente, la membrana se incubó durante 65 1 hora en presencia de anticuerpo secundario de ratón anti IgG acoplado con HRP (peroxidasa de rábano rusticano, Cell Signaling) diluido hasta 1:5.000 TBS de leche 5 %-Tween 0,1 % con agitación. Después de lavar varias veces,

en TBS-Tween 0,1 % durante 30 minutos, las proteínas de interés se detectaron por quimioluminiscencia (sustratos ECL, Amersham).

Inmuno-histoquímica

5 Se desparafinizaron secciones de pulmón de ratón de 5 µm de grosor incluidas en parafina en xileno (2 x 5 minutos) y se rehidrataron incubando 2 x 5 minutos en etanol 100 %, 2 x 5 minutos en etanol 95 % y 2 x 5 minutos en etanol 80 %. Después de lavar con agua, el antígeno se desenmascaró por desnaturalización térmica usando un tampón de citrato (pH = 6,0, DAKO) durante 20 minutos. Las secciones se enfriaron hasta temperatura ambiente y después se lavaron en TBS-Tween 0,1 %, y las peroxidases endógenas se inactivaron con peróxido de hidrógeno 3 % en TBS durante 10 minutos. Las secciones también se bloquearon para actividad de avidina/biotina, se bloquearon con reactivos de bloqueo sin suero y se incubaron con anticuerpo primario anti-CAV1 o anti alfa-SMA durante 1 hora a temperatura ambiente y durante una noche a 4 °C, respectivamente. Las proteínas de interés se detectaron después con diaminobenzidina (DAB, DAKO) después de incubar el anticuerpo secundario.

Hibridación *in situ*

La localización tisular de miR-199a-5p se detectó usando el sistema de sondas de LNA marcadas con DIG doble (Exiqon, Woburn, MA). Los tejidos de ratón incluidos en parafina se desparafinizaron en xileno (2 x 5 minutos) y se rehidrataron incubando 2 x 5 minutos en etanol 100 %, 2 x 5 minutos en etanol 95 % y 2 x 5 minutos en etanol 80 %. Los portaobjetos se lavaron después en PBS (pH 7,5) y se permeabilizaron incubando durante 15 minutos a 37 °C en proteinasa K (Ambion). Los portaobjetos se lavaron de nuevo en PBS, y se prehibridaron en un tampón de hibridación (formamida 50 %, SSC 5x, Tween 20 0,1 %, ácido cítrico 9,2 mM, heparina 50 µg/ml y ARN de levadura 500 µg/ml, pH 6) en una cámara húmeda. Las sondas de ALN marcadas con doble DIG se añadieron después a una concentración de 80 nM y se incubaron durante 2 horas a 50 °C en una cámara húmeda. Los portaobjetos se aclararon en soluciones de SSC 5x, SSC 1x, y SSC 0,2x a la misma temperatura de hibridación. Esto se siguió de bloqueo con suero de oveja 2 %, BSA 2 mg/ml en PBS + Tween 20 0,1 % (PBST) e incubación con fragmentos Fab anti-DIG-AP (1:800) (Roche Applied Sciences) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de lavar en PBST, la reacción teñida se produjo incubando en una solución de 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP)/nitro azul de tetrazolio (NBT) (Roche Applied Sciences) con levamisol 1 mM durante una noche a temperatura ambiente. La reacción teñida se detuvo después de observar suficiente desarrollo de precipitado azul lavando con PBST. Los portaobjetos se contratiñeron después con Fastred, se montaron y se cubrieron con un cubreobjetos.

Análisis de inmunofluorescencia

35 Se cultivaron células MRC5 en un cubreobjetos de vidrio redondo de 16 mm de diámetro (Thermo scientific) colocado en una placa de 12 pocillos. Se lavaron portaobjetos con cubreobjetos en solución salina tamponada con fosfato y se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 15 min, las células se permeabilizaron después usando Triton X-102 0,1 % (Agilent Technologies) durante 10 min y se bloquearon con solución de PBS que contenía BSA (3 %) durante 30 min. Se realizó incubación con anticuerpos primarios en una solución de bloqueo BSA (1 %) a 37 °C durante 1 h a las siguientes diluciones: α-SMA (1:1.000), CAV1 (1:50). Después de tres lavados con PBS, las células se incubaron con IgG secundario de cabra antirratón marcado con Alexa Fluor 488 (Invitrogen) (1:500), IgG de cabra anticonejo Alexa Fluor 647 (Invitrogen) (1:500) y faloidina Alexa Fluor® 647 (A22287, Life Technologies) (1 unidad/portaobjetos). 45 min después, se fijaron portaobjetos con cubreobjetos en portaobjetos de microscopio usando reactivo antidesfijación de oro ProLong® con DAPI (Invitrogen). Se visionó la fluorescencia con un microscopio de exploración confocal Olympus FV10i.

Estudio de proliferación celular

50 Los fibroblastos de pulmón humano (MRC-5 o hFL-1) se distribuyeron en placas de 6 pocillos (150.000 células por pocillo) en medio DMEM complementado con FCS 10 %. Al día siguiente, el medio de cultivo se reemplazó con medio sin suero y las células se transfectaron con pre-miR-199a-5p. La proliferación celular se evaluó después 48 horas después de la transfección por citometría de flujo usando el kit de ensayo de proliferación celular click-iT™ EdU (Invitrogen) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Estudio de migración celular: ensayo de curación *in vitro*

60 Los fibroblastos de pulmón humano (MRC-5 o hFL-1) se colocaron en placas de 12 pocillos (500.000 células por pocillo). A la confluencia, el medio de cultivo se reemplazó con medio sin suero y las células se transfectaron con pre-miR-199a-5p o un inhibidor anti miR-199-5p (LNA anti-miR-199-5p, Exiqon). 24 horas después de la transfección, las células se rasparon con una punta de pipeta y se trataron o no se trataron con TGFβ (20 ng/ml). Después se filmó el mecanismo de curación "*in vitro*" durante 24 horas después de raspado por microscopía en video usando un microscopio invertido Axiovert 200 M (Carl Zeiss) equipado con un inserto de regulación a CO₂ 5 % y 37 °C (Pecon GmbH). Se tomaron imágenes con fondo claro cada 30 minutos mediante una lente de contraste de fases de factor 10 con una cámara CCD CoolSNAPHQ operada usando software Metamorph (Roper Scientific). Se

calculó la movilidad celular evaluando el porcentaje de área reparada usando software de análisis de imágenes ImageJ.

Ensayo de invasión

5 Se evaluó la invasión de fibroblastos MRC5 que sobreexpresaban miR-199a-5p usando cámara de invasión de Matrigel BioCoat de 24 pocillos (BD Biosciences) disponible en el mercado. Brevemente, se transfectaron fibroblastos pulmonares con pre-miR-199a-5p o control negativo como se ha descrito anteriormente. 24 h después de la transfección, las células se recogieron con tripsina-EDTA, se centrifugaron y se resuspendieron en medio DMEM. Se añadieron suspensiones celulares (1×10^5 células/pocillo) en la cámara superior. Los pocillos de fondo de la cámara se cargaron con medio DMEM que contenía FBS 10 % como quimioatrayente, mientras que la cámara superior se cargó con DMEM solamente. Después de incubación durante 48 h a 37 °C, las células no invasoras en la parte superior de la membrana se retiraron con un hisopo de algodón. La membrana que contenía células invasoras se fijó con metanol, se lavó tres veces con PBS y se montó con DAPI hard set (Vector Laboratories) en portaobjetos de vidrio para microscopia de fluorescencia.

Análisis estadístico

20 Los resultados se proporcionaron como la media \pm el error típico de la media. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el ensayo de Student como se proporciona por Microsoft Excel™.

Ejemplo 2: Resultados

25 Los ratones resistentes y sensibles a fibrosis pulmonar presentan un perfil de expresión de miARN definido en respuesta a bleomicina

30 La bleomicina es la herramienta experimental elegida para inducir fibrosis pulmonar en diversos modelos animales, incluyendo ratones. De esta manera, se considera que los ratones de tipo C57BL/6 son sensibles a fibrosis pulmonar inducida por bleomicina mientras que los ratones de tipo BALB/c son resistentes. Para identificar los miARN potencialmente implicados en el proceso de fibrosis pulmonar, el perfil de expresión de miARN pulmonar en respuesta a bleomicina en ratones sensibles y resistentes a fibrosis pulmonar inducida por bleomicina (n=3 ratones por grupo) se estudió usando una plataforma basada en microplaca biológica (conjunto de datos 1, número de referencia GSE34812) descrito en otra parte [25, 26, 13]. En particular, el estudio de perfil de expresión se centró en la fase fibrótica del proceso de fibrosis, es decir 7 días y 14 días después de administrar bleomicina. El perfil de expresión identificado consiste en 22 miARN expresados diferencialmente de forma significativa entre los pulmones de animales de control y tratados con bleomicina en al menos un tipo, estando la mayoría regulados positivamente en pulmones en los que se ha instilado bleomicina (figura 1A). Resulta interesante que miR-199a-5p presentó aumento de la expresión en respuesta a bleomicina durante la progresión de fibrosis pulmonar solamente en ratones de tipo C57BL/6 (figura 1B). El aumento en el nivel de expresión de miR-199a-5p 14 días después de administrar bleomicina se confirmó independientemente por PCR en tiempo real en un gran número de animales (n = 5 ratones por grupo) (figura 2A). En consecuencia, estos resultados han demostrado que, en principio, miR-199a-5p desempeña un papel importante durante el proceso de fibrosis pulmonar.

45 Para estudiar los mecanismos de regulación que subyacen a producción de miR-199a-5p, se evaluó el estado de expresión de dos genes de ratón, miR-199a-1 (en el cromosoma 9) y miR-199a-2 (en el cromosoma 1), en respuesta a bleomicina usando el ensayo de Taqman diseñado para diferenciar entre pri-miR-199a-1 y pri-miR-199a-2. Los resultados demostraron que, 14 días después de instilar bleomicina, los dos transcritos de pri-miR-199a se regularon positivamente en los pulmones de ratones C57BL/6J (figura 2B) y por lo tanto contribuyen a la producción de miR-199a-5p.

50 Además, los ensayos de hibridación *in situ* realizados en secciones histológicas de pulmón obtenidas de ratones C57BL/6, 14 días después de administrar bleomicina (pulmones fibróticos) o PBS (pulmones sanos), revelaron expresión de miR-199a-5p selectiva en miofibroblastos en las áreas dañadas de los pulmones enfermos correspondientes a los sitios fibroblásticos (figura 1C).

55 Es importante observar que, en línea con estudios previos, se detectó regulación positiva de miR-21 en respuesta a bleomicina (figuras 1A). No obstante, la expresión de miR-21 aumentó significativamente en ambos tipos de ratón después de administrar bleomicina. Dado que miR-21 estaba previamente claramente asociado con el desarrollo de trastornos fibróticos incluyendo fibrosis pulmonar, estos resultados sugieren que BALB/c podría tener mecanismos compensatorios que contrarrestarían los efectos adversos de miR-21.

Identificación de dianas de miR-199a-5p específicas en fibroblastos de pulmón

65 Uno de los principales desafíos en la biología de miARN es el de ser capaz de identificar y caracterizar ARNm diana regulado experimentalmente. En este contexto, se combinaron enfoques por ordenador (software de bioinformática de predicción de diana) y enfoques experimentales (microplacas de transcriptoma), expresión de miARN ectópico y

vectores indicadores que contenían la parte 3'UTR de un gen de interés fusionado con luciferasa, como se ha descrito previamente [25, 13]. Se han propuesto varios algoritmos de predicción diana. Se basan en general en i) la complementariedad entre miARN y 3'UTR de ARNm diana en la región 5' de miARN (denominada "semilla") y ii) la conservación filogenética de esta secuencia en la 3'UTR de ARNm diana.

Para determinar los genes diana regulados por miR-199a-5p, se llevó a cabo perfil de ARNm de microplaca de expresión Agilent® (Agilent Technology) después de manipular el nivel de expresión de miR-199a-5p por transfección en fibroblastos de pulmón. La influencia de miR-199a-5p en el transcriptoma de fibroblastos de pulmón humano hFL1 se comparó con el de miR-21 (conjunto de datos 2, número de referencia GEO GSE34815). La expresión ectópica de cada miARN indujo modificaciones importantes en el transcriptoma 48 horas después de la transfección con genes modulados 1261 y 753 en contextos de miR-199a-5p y miR-21, respectivamente. Mientras que estos dos miARN indujeron perfiles de modulación muy diferentes (figura 3A), una anotación funcional de estos dos perfiles de identificación con identificación con software Ingenuity Pathway™ mostró un solapamiento para las "rutas canónicas" incluyendo "regulación del ciclo celular" y "señalización de TGFβ" (figura 4). En línea con estudios previos, se asociaron rutas muy significativas asociadas con miR-21 con "control de ciclo celular y ciclina" y "control de ciclo celular cromosómico", "reparación de desapareamiento en eucariotas" y "señalización de ATM". Mientras que la ruta de mayor puntuación para miR-199a-5p consistió en las rutas metabólicas de "biosíntesis de esteroides", también se observó enriquecimiento para las rutas asociadas con "señalización de integrina" y "señalización de endocitosis mediada por caveolina".

Después se buscaron las dianas potenciales directas en la población de transcritos regulados negativamente usando la herramienta MiRonTop. Esto indicó sobrerepresentación específica de dianas predichas en la población de transcritos regulados negativamente después de expresión de miR-199a-5p o miR-21 heteróloga, usando varias herramientas de predicción incluyendo una búsqueda de descendencia directa adicional o TargetScan (figura 3B).

El análisis se centró después en un subconjunto de transcritos que contenían hexámeros de miR-199a-5p complementarios en la 3'UTR de los mismos que presentaban la mayor inhibición de expresión. Tres herramientas de predicción diferentes, TargetScan, PicTar y miRanda, produjeron resultados diferentes, como se muestra en los diagramas de Venn representados en la figura 3C. Aunque un total de 92 transcritos fueron predichos por al menos uno de esos algoritmos, solamente 21 transcritos fueron predichos por los tres algoritmos diferentes (TargetScan, Pictar, MiRanda) usando la herramienta MiRonTop (<http://www.microarray.fr:8080/miRonTop/index>) (véase tabla 3 a continuación en el presente documento).

Tabla 3

Nombre del gen	Referencia	Descripción	ExprProm ¹	logFC ²
ACSL4	NM_004458	Miembro 4 de la familia de cadena larga de acil-CoA sintetasa de <i>Homo sapiens</i> (ACSL4), variante de transcrito 1, ARNm	10,56	-1,97
AKAP7	NM_016377	Proteína de anclaje de quinasa de <i>Homo sapiens</i> A (PRKA) 7 (AKAP7), variante de transcrito gamma, ARNm	9,25	-1,51
AP1S2	NM_003916	Complejo de proteína relacionada con adaptador de <i>Homo sapiens</i> 1, subunidad sigma 2 (AP1S2), ARNm	13,01	-1,37
ARCN1	NM_001655	Arcaína 1 de <i>Homo sapiens</i> (ARCN1), variante de transcrito 1, ARNm	11,99	-1,60
ARHGAP12	NM_018287	Proteína activadora de GTPasa Rho de <i>Homo sapiens</i> 12 (ARHGAP12), ARNm	11,12	-1,96
ATP6V1H	NM_015941	ATPasa de <i>Homo sapiens</i> , transportadora de H ⁺ , lisosómica 50/57 kDa, subunidad V1 H (ATP6V1H), variante de transcrito 1, ARNm	10,14	-1,86
BNC1	NM_001717	Basonuclina 1 de <i>Homo sapiens</i> 1 (BNC1), ARNm	8,87	-1,08
BTRC	NM_033637	Que contiene repetición de beta-transducina (BTRC) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	9,37	-1,33
C17orf63	NM_018182	Marco abierto de lectura 63 de cromosoma 17 (C17orf63) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 2, ARNm	11,90	-1,58
C18orf25	NM_145055	Marco abierto de lectura 25 de cromosoma 18 (C18orf25) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	9,74	-1,56
C1GALT1	NM_020156	Sintasa de núcleo 1, glucoproteína-N- acetilgalactosamina 3-beta-galactosiltransferasa, 1 (C1GALT1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	9,19	-1,68
C1orf213	NR_033690	Fase abierta de lectura 213 del cromosoma 1 (C1orf213) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARN no codificante	9,29	-1,69
C5orf13	NM_004772	Fase abierta de lectura 13 del cromosoma 5 (C5orf13) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	15,85	-1,03
C5orf24	NM_001135586	Fase abierta de lectura 24 del cromosoma 5 (C5orf24) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	11,26	-1,43
C9orf5	NM_032012	Fase abierta de lectura 5 del cromosoma 9 (C9orf5) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	12,19	-1,27

ES 2 642 188 T3

Nombre del gen	Referencia	Descripción	ExprProm ¹	logFC ²
CAV1	NM_001753	Caveolina 1, proteína de caveolas, 22 kDa (CAV1) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	15,28	-1,78
CDCA7L	NM_018719	Tipo asociado a ciclo de división celular 7 (CDCA7L) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	11,03	-1,55
CDH2	NM_001792	Cadherina 2, tipo 1, N-cadherina (neuronal) (CDH2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	13,27	-1,97
CHCHD4	NM_144636	Que contiene dominio de hélice superenrollada-hélice superenrollada 4 (CHCHD4) de <i>Homo sapiens</i> , gen nuclear que codifica proteína mitocondrial, variante de transcrito 2, ARNm	11,56	-1,35
CNOT6	NM_015455	Complejo de transcripción de CCR4-NOT, subunidad 6 (CNOT6) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	9,25	-1,36
CNPY2	NM_014255	Homólogo de canopy 2 (pez cebra) (CNPY2) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	15,41	-1,50
DCBLD2	NM_080927	Discoidina, que contiene dominio CUB y LCCL 2 (DCBLD2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	13,37	-2,87
DDR1	NM_013993	Tirosina quinasa receptora de dominio de discoidina 1 (DDR1) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 2, ARNm	9,57	-2,31
DISC1	NM_018662	Alterada en esquizofrenia 1 (DISC1) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito L, ARNm	10,00	-1,07
ELP2	NM_018255	Homólogo de proteína de elongación 2 (<i>S. cerevisiae</i>) (ELP2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	14,00	-1,54
EPAS1	NM_001430	Proteína de dominio PAS endotelial 1 (EPAS1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	14,79	-2,61
EPB41L1	NM_012156	Tipo banda de proteína de membrana de eritrocitos 4.1 1 (EPB41L1) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	12,88	-1,94
EXTL3	NM_001440	Tipo exostosis (múltiples) 3 (EXTL3) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	13,66	-1,20
FAM188A	NM_024948	Familia con similitud de secuencia 188, miembro A (FAM188A) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	11,55	-1,33
FBXO28	NM_015176	Proteína de F-box 28 (FBXO28) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	10,39	-1,73
FZD6	NM_003506	Homólogo de frizzled 6 (<i>Drosophila</i>) (FZD6) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	11,62	-2,07
GPD2	NM_001083112	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 2 (mitocondrial) (GPD2) de <i>Homo sapiens</i> , proteína mitocondrial que codifica gen nuclear, variante de transcrito 1, ARNm	9,81	-2,15
GPR56	NM_201525	Receptor acoplado a proteína G 56 (GPR56) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 3, ARNm	10,62	-1,14
GPRC5A	NM_003979	Receptor acoplado a proteína G, familia C, grupo 5, miembro A (GPRC5A) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	8,12	-2,04
HOXB6	NM_018952	Caja homeótica B6 (HOXB6) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	14,50	-1,10
HVCN1	NM_001040107	Canal abierto por tensión de hidrógeno 1 (HVCN1) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	7,86	-1,31
IKBKB	NM_001556	Inhibidor de potenciador de gen de polipéptido kappa en células B, quinasa beta (IKBKB) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	10,18	-1,31
IPO8	NM_006390	Importina 8 (IPO8) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	12,00	-2,09
ITFG3	NM_032039	Que contiene repetición de FG-GAP de integrina alfa 3 (ITFG3) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	13,18	-1,22
ITGA3	NM_002204	Integrina, alfa 3 (antígeno CD49C, subunidad alfa 3 de receptor de VLA-3) (ITGA3) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito a, ARNm	10,58	-2,66
KIF1B	NM_183416	Miembro de la familia de quinesina 1B (KIF1B) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 2, ARNm	12,31	-2,26
KLHL3	NM_017415	Tipo kelch 3 (<i>Drosophila</i>) (KLHL3) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	8,44	-1,32
KPNA4	NM_002268	Carioferina alfa (importina alfa 3) (KPNA4) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	13,44	-1,11
LEPREL1	NM_018192	Tipo leprecano 1 (LEPREL1) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	13,48	-1,21
MAP3K11	NM_002419	Proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógeno 11 (MAP3K11) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	13,11	-2,77
MAPKAPK3	NM_004635	Proteína quinasa activada por proteína quinasa activada por mitógeno 3 (MAPKAPK3) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	11,13	-1,16
MAX	NM_145113	Factor X asociado con MYC (MAX) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 3, ARNm	13,11	-1,21

ES 2 642 188 T3

Nombre del gen	Referencia	Descripción	ExprProm ¹	logFC ²
MCFD2	NM_139279	Deficiencia en factor de coagulación múltiple 2 (MCFD2) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	12,48	-1,21
MPP5	NM_022474	Proteína de membrana, palmitoilada 5 (miembro de la subfamilia MAGUK p55 5) (MPP5) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	11,76	-1,99
NAB1	NM_005966	Proteína de unión a NGFI-A 1 (proteína de unión a EGR1 1) (NAB1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	9,59	-1,23
NAV3	NM_014903	Navegador de neuronas 3 (NAV3) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	10,22	-1,36
NCEH1	NM_020792	Éster hidrolasa de colesterol neutro 1 (NCEH1) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 2, ARNm	11,44	-1,64
NCSTN	NM_015331	Nicastrina (NCSTN) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	13,89	-1,02
NFKB1	NM_003998	Factor nuclear de potenciador génico de polipéptido ligero kappa en células B 1 (NFKB1) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	11,43	-1,25
NLK	NM_016231	Quinasa de tipo nemo (NLK) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	11,36	-1,63
NOTCH2NL	NM_203458	Tipo notch 2 N terminal (NOTCH2NL) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	12,92	-1,74
PCYOX1	NM_016297	Prenilcisteína oxidasa 1 (PCYOX1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	12,23	-1,84
PEX3	NM_003630	Factor de biogénesis peroxisómica 3 (PEX3) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	9,79	-1,43
PHF6	NM_032335	Proteína de dedos de PHD 6 (PHF6) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 3, ARNm	8,48	-1,60
PIK3CD	NM_005026	Fosfoinositida-3-quinasa, catalítica, polipéptido delta (PIK3CD) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	9,18	-1,96
PLAU	NM_002658	Activador de plasminógeno, uroquinasa (PLAU), variante de transcrito 1 de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	15,54	-2,48
PLXND1	NM_015103	Plexina D1 (PLXND1) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	12,63	-1,40
PODXL	NM_00101811	Tipo podocalixina (PODXL) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	11,21	-2,59
PPP1R2	NM_006241	Proteína fosfatasa 1, subunidad reguladora (inhibidora) 2 (PPP1 R2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	11,29	-2,50
PPP2R3A	NM_002718	Proteína fosfatasa 2, subunidad reguladora B", alfa (PPP2R3A) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	11,82	-1,34
PRKAA1	NM_206907	Proteína quinasa, activada por AMP, subunidad catalítica alfa 1 (PRKAA1) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 2, ARNm	9,36	-1,59
PTGS1	NM_000962	Prostaglandina-endoperoxido sintasa 1 (prostaglandina G/H sintasa y ciclooxigenasa) (PTGS1) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	10,61	-1,67
PXN	NM_002859	Paxilina (PXN) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 2, ARNm	14,99	-1,41
R3HDM2	NM_014925	Que contiene dominio R3H 2 (R3HDM2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	11,95	-1,32
RBM24	NM_153020	Proteína de motivo de unión a ARN 24 (RBM24) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 2, ARNm	8,66	-2,44
RNF11	NM_014372	Proteína de dedo de anillo 11 (RNF11) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	14,30	-1,09
RNF141	NM_016422	Proteína de dedo de anillo 141 (RNF141) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	11,70	-1,52
RPS6KA3	NM_004586	Proteína ribosómica S6 quinasa, 90 kDa, polipéptido 3 (RPS6KA3) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	10,64	-1,59
RTN4	NM_020532	Reticulón 4 (RTN4) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	17,62	-1,01
SCCPDH	NM_016002	Sacaropino deshidrogenasa (potencial) (SCCPDH) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	13,63	-1,10
SERPINE1	NM_000602	Inhibidor de serpina peptidasa, clado E (nexina, inhibidor de activador de plasminógeno tipo 1), miembro 1 (SERPINE1) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	10,72	-1,98
SLC14A1	NM_001146037	Familia de transportador de soluto 14 (transportador de urea), miembro 1 (grupo sanguíneo de Kidd) (SLC14A1) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 4, ARNm	11,83	-1,95
SLC35A2	NM_001042498	Familia de transportador de soluto 35 (transportador de UDP-galactosa), miembro A2 (SLC35A2) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 3, ARNm	11,12	-1,58
SRGN	NM_002727	Serglicina (SRGN) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	9,68	-1,40
SSH2	NM_033389	Homólogo de slingshot (<i>Drosophila</i>) (SSH2) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	10,81	-1,28
ST6GAL1	NM_173216	ST6 beta-galactosamida alfa-2,6-sialiltransferasa 1 (ST6GAL1) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	10,67	-1,70
TAF9B	NM_015975	ARN polimerasa II TAF9B, factor asociado a proteína de unión a caja TATA (TBP), 31 kDa (TAF9B) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	9,77	-2,25
TSPAN6	NM_003270	Tetraspanina 6 (TSPAN6) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	12,41	-1,65

Nombre del gen	Referencia	Descripción	ExprProm ¹	logFC ²
TST	NM_003312	Tiosulfato sulfurtransferasa (rodanés) (TST), gen nuclear que codifica proteína mitocondrial de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	14,03	-2,02
TXNDC12	NM_015913	Que contiene dominio de tiorredoxina 12 (retículo endoplásmico) (TXNDC12) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	11,33	-1,74
UHMK1	NM_175866	Motivo de homología U2AF (UHM) quinasa 1 (UHMK1) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	10,14	-2,57
VPS26A	NM_004896	Homólogo de clasificación de proteína vacuolar 26 A (<i>S. pombe</i>) (VPS26A) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	12,37	-1,60
ZNF512	NM_032434	Proteína de dedo de cinc 512 (ZNF512) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	10,47	-1,16
ZNF512B	NM_020713	Proteína de dedo de cinc 512B (ZNF512B) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	12,08	-1,02
ZNF584	NM_173548	Proteína de dedo de cinc 584 (ZNF584) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	9,46	-1,41
ZNF706	NM_001042510	Proteína de dedo de cinc 706 (ZNF706) de <i>Homo sapiens</i> , variante de transcrito 1, ARNm	8,15	-1,10
ZNF776	NM_173632	Proteína de dedo de cinc 776 (ZNF776) de <i>Homo sapiens</i> , ARNm	9,93	-1,22

¹ logaritmo (base 2) de la intensidad promedio (ExprProm)
² logaritmo (base 2) de la relación de miR-199a-5p / miR-Neg (logFC)

Un análisis de red genética se centró después en estas 21 dianas, y se identificó una lista más limitada de genes candidatos asociados con las rutas canónicas más significativas descritas anteriormente. Finalmente, se compararon los niveles de expresión de estos genes candidatos con los ortólogos de ratón de los mismos en un modelo de bleomicina usando microplacas biológicas de genoma completo (ratones C57BL/6J 14 días después de instilar bleomicina o PBS, conjunto de datos 3, número de referencia GEO GSE34814). Se observó que 4 de las 21 mejores dianas potenciales de miR-199a-5p también estaban reguladas negativamente en tejido pulmonar fibrótico: ARHGAP12, CAV1, MAP3K11 y MPP5 (tabla 3). De estas, parecería que la caveolina 1 (CAV1) representa una diana clave de miR-199a-5p, basándose en estudios previos que demuestran una conexión significativa entre la regulación negativa de CAV1 en fibroblastos de pulmón y efectos mediados por TGFβ adversos [Wang *et al.*, J. Exp. Med., 203: 2895-2906, 2006; Xia *et al.*, Am. J. Pathol., 176: 2626-2637, 2010] [23, 31].

Validación de caveolina 1 (CAV1) como una diana de miR-199a-5p

La Caveolina 1 (CAV1) es una proteína de membrana de 22 kDa esencial para la formación de invaginaciones de membrana plasmática pequeñas denominadas caveolas. Las caveolas se encuentran en la mayoría de tipos celulares, en diversas cantidades según el tejido. Son particularmente abundantes en células diferenciadas tales como adipocitos, células endoteliales, neumocitos tipo I, fibroblastos y células de músculo liso y estriado. Las caveolas representan una subcategoría de balsas lipídicas, morfológicamente identificables debido a la forma invaginada y circular de las mismas, y caracterizadas por la presencia de proteínas estructurales denominadas caveolina 1, caveolina 2 y caveolina 3. Caveolina 1 y 2 tienen una distribución relativamente ubicua en la mayoría de células diferenciadas con la excepción de fibras de músculo esquelético y miocitos cardíacos [Scherer *et al.*, J. Cell Biol., 127: 1233-1243, 1994] [20]. La expresión de caveolina 3 está restringida a los músculos esqueléticos, el diafragma y el corazón [Tang *et al.*, J. Biol. Chem., 271: 2255-2261, 1996] [21]. Resulta interesante que algunos estudios han demostrado recientemente que los ratones transgénicos en los que se ha suprimido el gen de la caveolina 1 presentan diversas anomalías, particularmente en los pulmones [Park *et al.*, Biochemistry, 42: 15124-15131, 2003] [22]. Estos ratones en particular desarrollan fibrosis pulmonar y proliferación de células endoteliales. Estudios *in vitro* también han demostrado que la reducción de la expresión de caveolina 1 en células de fibroblastos de pulmón promueve los efectos profibróticos de TGFβ en este tipo celular, particularmente la activación, proliferación y diferenciación de fibroblastos en miofibroblastos [Wang *et al.*, 2006, citado anteriormente] [23].

Usando el algoritmo de MicroCible, se identificó un sitio de unión potencial para miR-199a-5p en la secuencia 3'UTR de CAV1 (figura 5A). Para evaluar si miR-199a-5p altera la expresión de CAV1, se clonó la 3'UTR de CAV1 humana en vector psiCHECKTM-2 cadena abajo de la secuencia que codifica luciferasa y se cotransfectó en células HEK293 en presencia de miR-199a-5p o un miARN de control negativo (figura 5A). Como control, también se usó una construcción de 3'UTR de CAV1 mutada en el sitio de miR-199a-5p predicho. Pre-miR-199a-5p humano indujo una reducción significativa en la actividad luciferasa normalizada en relación con el control en presencia de la construcción de tipo silvestre solamente, lo que confirma que representa un sitio funcional. Además, la transfección de pre-miR-199a-5p en fibroblastos de pulmón MRC5 y hFL1 dio lugar a una reducción significativa y específica en CAV1 con respecto a los niveles de ARNm y proteína mientras que miR-21 no tuvo ningún efecto significativo (figuras 5B-5D y 6).

TGFβ regula la expresión de miR-199a-5p y CAV1 en fibroblastos de pulmón

Se estudió si la reducción de la expresión de CAV1 después de estimulación con TGFβ está asociada con un aumento en la expresión de miR-199a-5p. Para ensayar esta hipótesis, la línea celular MRC5 se expuso a TGFβ, y se analizaron los niveles de expresión de CAV1 y miR-199a-5p. Como se detecta por RT-PCR Taqman, el

tratamiento de fibroblastos humanos con TGFβ durante 24 a 48 horas dio lugar a una reducción notable de ARNm de CAV1, mientras que la expresión de miR-199a-5p se reguló positivamente de forma significativa (figuras 7A y 7B). Finalmente, también se observó una reducción dependiente del tiempo en los niveles de proteínas CAV1 después del tratamiento con TGFβ (figura 7C). Todos estos resultados demuestran que, en principio, miR-199a-5p puede contribuir a la regulación negativa dependiente de TGFβ de la expresión de CAV1 en fibroblastos humanos.

Para investigar adicionalmente si miR-199-5p está implicado en la regulación negativa inducida por TGFβ de CAV1, se realizaron experimentos adicionales usando un inhibidor basado en LNA de miR-199a-5p así como bloqueador de sitio diana basado en LNA que evita la unión de miR-199-5p en ARNm de 3'UTR CAV1 (protector de CAV1) para interferir específicamente con la unión de miR-199a-5p en 3'UTR de CAV1. Como se representa en la Figura 7D, tanto el silenciamiento mediado por LNA de miR-199a-5p como el bloqueo de la unión de miR-199a-5p en 3'UTR de CAV1 inhiben la regulación negativa inducida por TGFβ de CAV1. En su conjunto estos resultados demuestran que, en fibroblastos de pulmón, la inducción de miR-199a-5p en respuesta a TGFβ media en la regulación negativa de CAV1 mediante la unión en un sitio único localizado en 3'UTR de CAV1.

Expresión de CAV1 alterada en pulmones de ratones que padecen fibrosis pulmonar inducida por bleomicina

Se estudió la expresión de CAV1 en pulmones de ratones fibróticos. En línea con estudios previos, los datos muestran una reducción significativa en el nivel de proteína CAV1 y expresión de ARNm en ratones C57BL/6J, 14 días después de administrar bleomicina (figuras 8A, 8B y 8C). Además, la tinción inmunohistoquímica de CAV1 en secciones tisulares de pulmón obtenidas de ratones C57BL/6J 14 días después de tratamiento con bleomicina, demostró una reducción notable en CAV1 en el área fibrótica de los pulmones (figura 8D). Colectivamente, estos resultados demostraron que, en fibroblastos de pulmón, la regulación positiva de la expresión de miR-199a-5p en pulmones de ratón fibrótico se correlaciona con la regulación negativa de CAV1.

Debería observarse que los ratones BALB/c, para los que la expresión de miR-199a-5p no está regulada positivamente en respuesta a bleomicina, no presentaron una reducción significativa del nivel de expresión de ARNm de CAV1 14 días después del tratamiento con bleomicina (figura 9).

Expresión alterada de CAV1 y miR-199a-5p en pulmones de pacientes que padecen FPI

Se estudió si la expresión de miR-199a-5p también está desregulada en pulmones de pacientes que padecen FPI, usando un conjunto de datos publicado recientemente (número de referencia GEO GSE13316) que consiste en 10 muestras de FPI y 10 muestras de control. Resulta interesante que, en comparación con el control, la expresión de miR-199a-5p en las muestras de FPI aumentó muy significativamente ($p = 0,005$, $p = 0,006$, tabla 1).

Estos resultados se estudiaron después en una cohorte mayor de pacientes con FPI (FPI $n = 94$ y control $n = 83$) donde la correlación inversa entre CAV1 y miR-199a-5p observada en ratones se confirmó en seres humanos (figuras 11A y 11B). De esta manera, los pulmones de pacientes con FPI presentaron expresión de miR-199a-5p aumentada significativamente junto con expresión de CAV1 reducida significativamente en comparación con pulmones sanos. La relación lineal para CAV1 entre FPI y el control fue de 0,54 ($FDR < 0,05$) y la relación lineal para miR-199a-5p para los mismos sujetos fue de 1,35 ($p < 0,05$). Finalmente, el examen de las secciones pulmonares sujetas a FPI demostró la expresión de miR-199a-5p en fibroblastos de pulmón junto con expresión reducida de CAV1 (figuras 11C y 11D).

Activación fibrogénica mediada por miR-199a-5p de fibroblastos de pulmón

Dado que el nivel de expresión de CAV1 es un factor crítico implicado en la activación fibrogénica de fibroblastos de pulmón, se ha estudiado si la sobreexpresión de miR-199a-5p en fibroblastos de pulmón es suficiente para recapitular los efectos profibróticos conocidos asociados con una reducción de la expresión de CAV1 (es decir proliferación, migración y diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos). Como se representa en la figura 12, el aumento de los niveles de miR-199a-5p transfectando precursores de miR-199a-5p dio lugar a un aumento significativo en la migración de fibroblastos de pulmón (figuras 12A y 12B), invasión (figura 12C) y proliferación (figura 12D). Además, la sobreexpresión de miR-199a-5p también dio lugar a un aumento en la expresión de ACTA2 (lo que marca la diferenciación de miofibroblastos) (Figura 12E), así como a una potencialización significativa de la inducción de COL1A1 en respuesta a TGFβ (Figura 12F).

Se ha estudiado si miR-199a-5p tiene efectos profibróticos adicionales independientemente de la regulación de CAV1. Para este fin, el perfil de expresión genética obtenido en fibroblastos de pulmón transfectados con precursores de miR-199a-5p se comparó con el obtenido después de transfección con un ARNiP dirigido específicamente contra CAV1. Resulta interesante que se detectó algo de solapamiento entre las dos identificaciones, esencialmente entre los transcritos regulados negativamente (figura 13A, grupo 2), con el 34 % de los transcritos regulados negativamente por miR-199a-5p también reprimidos por ip-CAV1 (figura 13B).

Para los fines de familiarización con las rutas moduladas por miR-199a-5p, se analizaron las rutas canónicas de Ingenuity Pathways™ de miR-199a-5p y se compararon con las de los contextos de miR-21 e ip-CAV1. Como se

muestra en el árbol de decisión de la figura 14A, los grupos jerárquicos apoyan la proximidad entre las rutas reguladas por miR-199a-5p e ip-CAV1. También se detectaron rutas específicas para miR-199a-5p, particularmente algunas asociadas con inflamación, tales como “señalización de IL-1”, “señalización de respuesta de fase aguda” y “señalización de MAPK P38”, que son todas típicas de procesos fibróticos. De los genes regulados específicamente por miR-199a-5p, se detectó una pluralidad de genes profibróticos conocidos con actividades biológicas definidas, y para los que se confirmó la expresión anómala *in vivo* (figuras 10 y 15). Esto confirma que miR-199a-5p regula múltiples rutas de señalización diferentes implicadas en la fibrogénesis pulmonar. En particular, en comparación con células transfectadas con ip-CAV1, la sobreexpresión de miR-199a-5p aumentó la expresión de CCL2, TGFBR1 y MMP3 de forma significativa y redujo la expresión de CAV1 y PLA2 de forma significativa (figura 16). Debería observarse que estos dos genes regulados negativamente se interpretan como dianas directas de miR-199a-5p basándose en el algoritmo de Pictar.

MiR-199a-5p es un efector de la señalización TGFβ en fibroblastos de pulmón regulando CAV1

Finalmente se ha demostrado que miR-199a-5p está implicado en la señalización de TGFβ. Para esto, se definió una identificación de señalización de TGFβ experimentalmente en fibroblastos de pulmón y se comparó con la identificación de miR-199a-5p usando el método de GSEA. Este análisis mostró un solapamiento significativo entre estas dos identificaciones, evaluadas con puntuaciones de enriquecimiento normalizadas mayores de 1 (1,4 y 2,17 para genes regulados positiva y negativamente, respectivamente, con un p valor nominal y un q valor de FDR < 0,05), lo que demuestra que miR-199a-5p es, en un principio, un mediador de respuesta TGFβ en fibroblastos pulmonares (figura 14B).

Para demostrar adicionalmente la importancia de miR-199a-5p en la respuesta de TGFβ, se realizó silenciamiento de miR-199a-5p en fibroblastos de pulmón usando inhibidores basados en LNA. En particular, se ha mostrado que el silenciamiento mediado por LNA de miR-199a-5p inhibió fuertemente la diferenciación inducida por TGFβ de fibroblastos de pulmón en miofibroblastos (Figuras 14C), señalización de SMAD (Figura 14D) y estimulación de reparación de heridas ralentizando el cierre de heridas significativamente (Figuras 14E y 14F).

Notablemente, se obtuvieron resultados similares usando un bloqueador de sitio diana basado en LNA (protector de CAV1) que demuestra por lo tanto que miR-199a-5p es un factor clave de la respuesta de TGFβ mediante regulación de CAV1 (Figuras 14C, 14D, 14E, 14F).

MiR-199a-5p está desregulado en modelos de fibrosis renal y cirrosis (fibrosis hepática) de ratón

Cada vez más pruebas sugieren que el miARN participa en el proceso fibrótico en diversos órganos tales como el corazón, los riñones, el hígado o los pulmones. Por ejemplo, estudios previos han mostrado que miR-21 tiene un papel importante en fibrosis pulmonar y cardíaca. De esta manera, se ha estudiado si miR-199a-5p también está desregulado en una forma de fibrosis tisular, es decir fibrosis renal y hepática usando modelos experimentales de ratón bien caracterizados. Para este fin, los perfiles de expresión de miARN obtenidos en estos modelos de fibrosis se compararon usando la misma plataforma basándose en los miARN. Se identificaron 5 miARN desregulados rutinariamente a un p valor < 0,01 (figura 17). De estos miARN, 3 estaban regulados negativamente (miR-193, miR-30b y miR-29c) y 2 estaban regulados positivamente (miR-199a-3p y miR-199a-5p) (véase tabla 4 a continuación en el presente documento).

Tabla 4

miARN	Secuencia de miARN	Cambio de expresión
mmu-miR-193	AACUGGCCUACAAAGUCCCAGU (SEQ ID NO: 5)	Negativa
mmu-miR-29c	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA (SEQ ID NO: 6)	Negativa
mmu-miR-30b	UGUAAACAUCCUACACUCAGCU (SEQ ID NO: 7)	Negativa
mmu-miR-199a-3p	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA (SEQ ID NO: 8)	Positiva
mmu-miR-199a-5p	CCCAGUGUUCAGACUACCGUUC (SEQ ID NO: 9)	Positiva

El aumento de la expresión de miR-199a-5p se confirmó en dos modelos experimentales de fibrosis hepática independientes (figuras 19A, 19B y 19C) y se correlacionó con la gravedad de la fibrosis hepática, dado que los ratones BALB/c tienen fibrosis hepática más pronunciada que los ratones C57BL/6, después de administrar CCl₄ (figuras 19A y 19B). Además, la expresión de miR-199a-5p se redujo significativamente durante la regresión de la fibrosis hepática experimental inducida por CCl₄ (figura 19D). Además, se ha demostrado que la exposición de células estrelladas a TGFβ estaba asociada con un aumento en la expresión de miR-199a-5p y una reducción en el nivel de expresión de CAV1 (figuras 19E y 19F). Resulta interesante que también se observó expresión potenciada de miR-199a-5p en muestras clínicas de pacientes con fibrosis hepática (Figura 18).

De forma similar, los datos obtenidos del modelo de fibrosis renal de obstrucción ureteral unilateral demostraron un aumento en miR-199a-5p en riñones dañados en comparación con ratones que se sometieron al procedimiento de control (figura 20A). Resulta interesante que, como en el caso de fibrosis pulmonar, la expresión de miR-199a-5p renal se correlacionó con una progresión del trastorno (figura 20A). Como se representa en la figura 20B, la hibridación *in situ* realizada 28 días después del procedimiento (es decir cuando se establece la fibrosis) no presentó ninguna señal detectable para miR-199a-5p en riñones normales, mientras que la señal de hibridación aumentó significativamente en todos los riñones dañados en el área compatible con miofibroblastos. Además, la inmunohistoquímica de CAV1 realizada en riñones de ratón fibróticos 28 días después del procedimiento demostró una reducción notable en la expresión de CAV1 en el área fibrótica de los riñones (figura 20C).

Lista de referencias

1. Wynn, J. Clin. Invest., 117: 524-529, 2007
2. Wynn, Nat. Rev. Immunol., 4: 583-594, 2004
3. Wilson and Wynn, Mucosal. Immunol., 2: 103-121, 2009
4. Ambros, Nature, 431: 350-355, 2004
5. Brennecke *et al.*, PLoS. Biol., 3: e85, 2005
6. Xie *et al.*, Nature, 434: 338-345, 2005
7. Berezikov *et al.*, Cell, 120: 21-24, 2005
8. Mitchell *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 105: 10513-10518, 2008
9. Weber *et al.*, Clin. Chem., 56: 1733-1741, 2010
10. Lu *et al.*, Nature, 435: 834-838, 2005
11. Jiang *et al.*, Clin. Cancer Res., 14(2): 419-427, 2008
12. Mascaux *et al.*, Eur. Respir. J., 33(2): 352-359 (Epub 2008), 2009
13. Puisségur *et al.*, Cell Death. Differ., 18(3): 465-478, 2011
14. Krutzfeldt *et al.*, Nature, 438: 685-689, 2005
15. Lanford *et al.*, Science, 327: 198-201, 2010
16. Jiang *et al.*, FEBS J., 277: 2015-2021, 2010
17. Liu *et al.*, J. Exp. Med., 20: 1589-1597, 2010
18. Pandit *et al.*, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 182: 220-229, 2010
19. Pandit *et al.*, Transl. Res., 157: 191-199, 2011
20. Scherer *et al.*, J. Cell Biol., 127: 1233-1243, 1994
21. Tang *et al.*, J. Biol. Chem., 271: 2255-2261, 1996
22. Park *et al.*, Biochemistry, 42: 15124-15131, 2003
23. Wang *et al.*, J. Exp. Med., 203: 2895-2906, 2006
24. Roderbrug *et al.*, Hepatol., 53: 209-218, 2011
25. Pottier *et al.*, PLoS. One, 4: e6718, 2009
26. Triboulet *et al.*, Science, 315: 1579-1582, 2007
27. Le y Barbry, Bioinformatics, 23: 1304-1306, 2007
28. Subramanian *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 102: 15545-15550, 2005
29. Le *et al.*, Bioinformatics, 26: 3131-3132, 2010
30. Van *et al.*, Nat. Methods, 5: 1023-1025, 2008
31. Xia *et al.*, Am. J. Pathol., 176: 2626-2637, 2010
32. Demedts y Costabel, Eur. Respir. J., 19: 794-796, 2002
33. Steele *et al.*, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 172: 1146-1152, 2005
34. WU *et al.*, BMC. Bioinformatics, 6: 309, 2005
35. Freier y Altman, Nucl. Acid Res., 25: 4429-4443, 1997
36. Uhlmann, Curr. Opinion in Drug Development, 3: 293-213, 2000
37. Rajwanshi *et al.*, Angew Chem. Int. Ed. Engl., 39 (9): 1656-1659, 2000
38. Lewis *et al.*, Cell, 120(1): 15-20, 2005

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> CENTRE HOSPITALIER REGIONAL UNIVERSITAIRE DE LILLE CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
 MARI, BeARNrd
 POTTIER, Nicolas
 MARCET, Brice
 BARBRY, Pascal
- <120> Uso de miR-199a-5p, dianas y/o inhibidores del mismo para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de trastornos fibroproliferativos
- <130> BIP212745PC00
- <150> FR1251089

<151> 06-02-2012

<160> 13

5 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 99
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido hsa-CAVI WT (sentido)

15 <400> 1

tcgaggacac ttaattacc aacctgttac ctactttgac tttttgcatt taaaacagac 60

actggcatgg atatagtttt acttttaaac tgtgtacgc 99

<210> 2
 <211> 99
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>
 25 <223> Oligonucleótido hsa-CAVI WT (antisentido)

<400> 2

ggcccggtac acagtttaa agtaaaacta tatccatgcc agtgtctggt ttaaatgcaa 60

aaagtcaaag taggtaacag gttggtaatt aaagtgtcc 99

30 <210> 3
 <211> 99
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Oligonucleótido hsa-CAVI MUT (sentido)

<400> 3

40 <210> 4
 <211> 99
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial

<220>
 50 <223> Oligonucleótido hsa-CAVI MUT (antisentido)

<400> 4

ggcccggtac acagtttaa agtaaaacta tatccatgcc actctctggt ttaaatgcaa 60

aaagtcaaag taggtaacag gttggtaatt aaagtgtcc 99

55 <210> 5

<211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> mmu-miR-193
 <400> 5
 aacuggccua caaagucca gu 22
 10 <210> 6
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> mmu-miR-29c
 <400> 6
 uagcaccuu ugaaaucggu ua 22
 20 <210> 7
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> mmu-miR-30b
 <400> 7
 uguaaacauc cuacacucag cu 22
 30 <210> 8
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> mmu-miR-199a-3p
 <400> 8
 acaguagucu gcacauuggu ua 22
 40 <210> 9
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> mmu-miR-199a-5p
 <400> 9
 cccaguguuc agacuaccug uuc 23
 50 <210> 10
 <211> 30
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> 3'UTR CAV1 humana
 <400> 10
 acuuuuugca uuuaaacag acacuggcau 30
 60 <210> 11
 65

ES 2 642 188 T3

<211> 30
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> 3'UTR CAV1 de ratón

<400> 11
auuguuugca uuuaaaacag acacuggcau 30

10 <210> 12
<211> 30
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> 3'UTR CAV1 de rata

<400> 12
auuguuccca uuugaaacag acacuggcau 30

<210> 13
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> miR-199a-5p

30 <400> 13
cuuguccauc agacuuguga ccc 23

REIVINDICACIONES

1. Un inhibidor de miR-199a-5p para uso en la prevención y/o el tratamiento de un trastorno fibroproliferativo.
- 5 2. Un inhibidor de miR-199a-5p para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el trastorno fibroproliferativo es fibrosis pulmonar idiopática.
3. Un inhibidor de miR-199a-5p para uso como un producto medicinal.
- 10 4. Método de diagnóstico *in vitro* para un trastorno fibroproliferativo en un sujeto caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
 - (i) medición cuantitativa del nivel de expresión de miR-199a-5p en una muestra biológica de dicho sujeto;
 - 15 (ii) comparar la expresión de miR-199a-5p de la muestra biológica de dicho sujeto con la misma expresión de miR-199a-5p de una muestra biológica de referencia;
 - (iii) identificar y medir en la muestra biológica de dicho sujeto la expresión de un gen diana para el que el nivel de expresión está regulado por el nivel de miR-199a-5p identificado en la etapa (ii); en el que dicho gen diana codifica caveolina 1;
 - 20 (iv) comparar el nivel de expresión de caveolina 1 en la muestra biológica de dicho sujeto con la expresión de caveolina 1 de una muestra biológica de referencia; y
 - (v) determinar si los niveles de la expresión de miR-199a-5p y de la expresión de caveolina 1 se asocian con un trastorno fibroproliferativo.
- 25 5. Método para identificar un sujeto susceptible de desarrollar un trastorno fibroproliferativo caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
 - (i) medición cuantitativa del nivel de expresión de miR-199a-5p en una muestra biológica de dicho sujeto;
 - (ii) comparar el nivel de expresión de miR-199a-5p en dicha muestra biológica de dicho sujeto con el nivel de
 - 30 expresión de miR-199a-5p en una muestra biológica de referencia;
 - (iii) identificar y medir en la muestra biológica de dicho sujeto el nivel de expresión de un gen diana para el que el nivel de expresión está regulado por el nivel de expresión de miR-199a-5p identificado en la etapa (ii); en el que dicho gen diana codifica caveolina 1;
 - (iv) comparar el nivel de expresión de caveolina 1 en la muestra biológica de dicho sujeto con el nivel de
 - 35 expresión de caveolina 1 de una muestra biológica de referencia; y
 - (v) detectar un aumento en el nivel de expresión de miR-199a-5p y una reducción en el nivel de expresión de caveolina 1.
6. Un inhibidor de miR-199a-5p para uso en la estimulación de la reparación de heridas.
- 40 7. Un método para supervisar la progresión de un trastorno fibroproliferativo en un sujeto, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
 - (i) medición cuantitativa del nivel de expresión de miR-199a-5p y del nivel de expresión de un gen diana para el
 - 45 que dicho nivel de expresión está regulado por el nivel de expresión de miR-199a-5p y en el que dicho gen diana codifica caveolina 1, en muestras biológicas de dicho sujeto tomadas a diferentes intervalos;
 - (ii) comparar el nivel de expresión de miR-199a-5p y del nivel de expresión de dicho gen diana en cada una de dichas muestras de dicho sujeto, y determinar si hay progresión del trastorno fibroproliferativo o no.

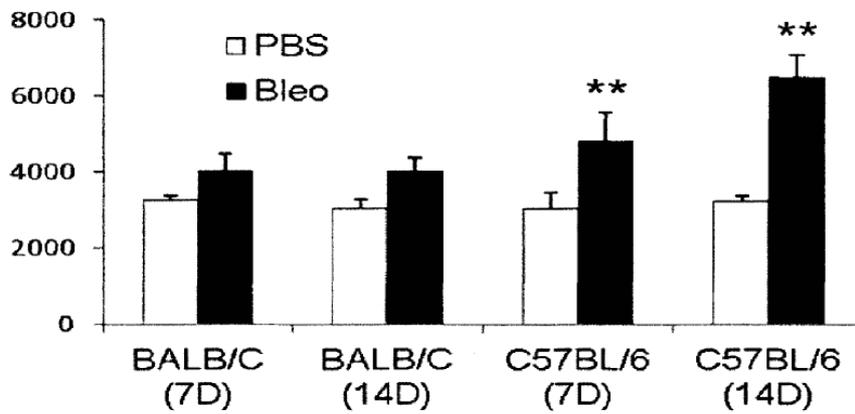
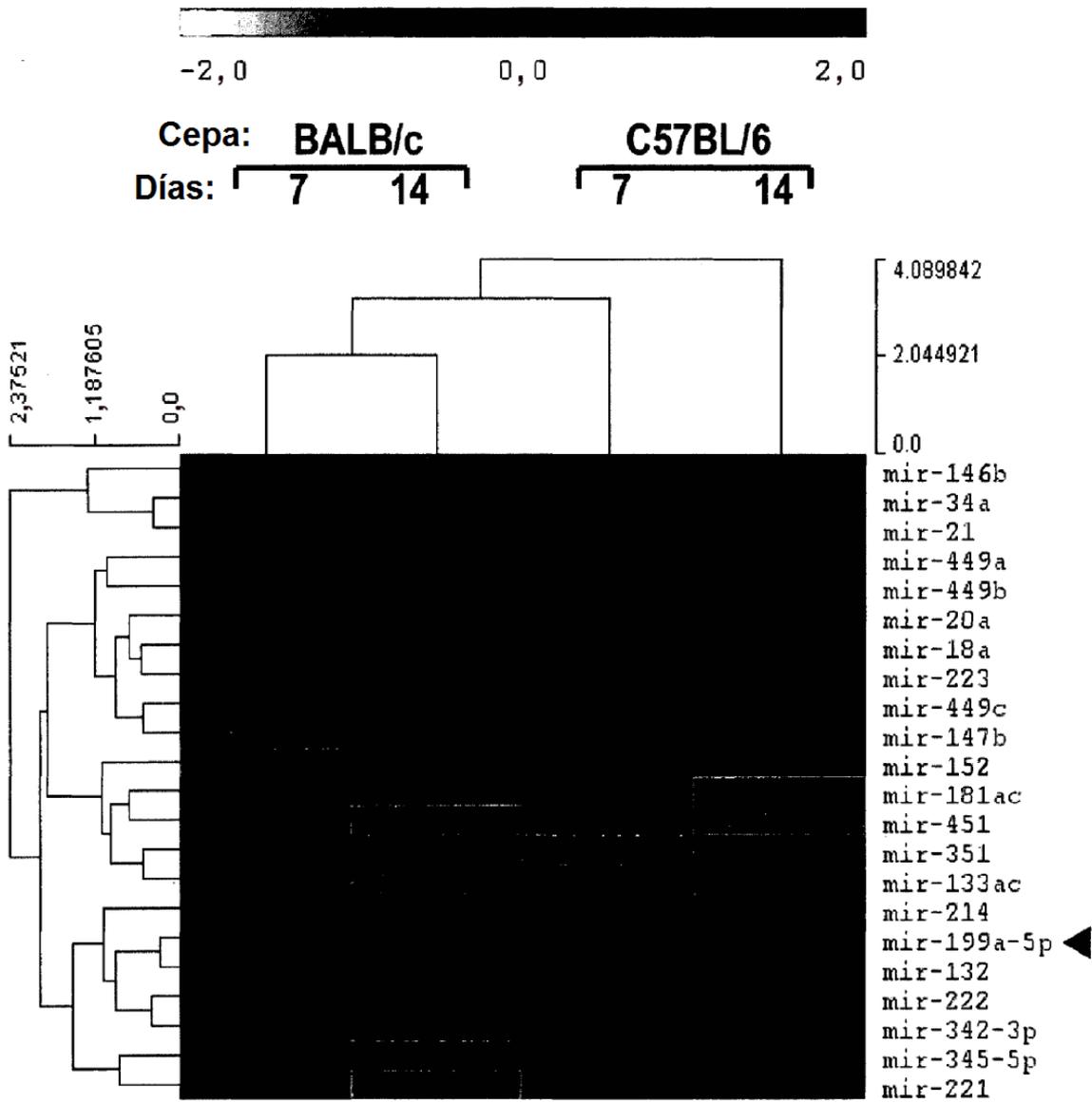


FIGURA 1

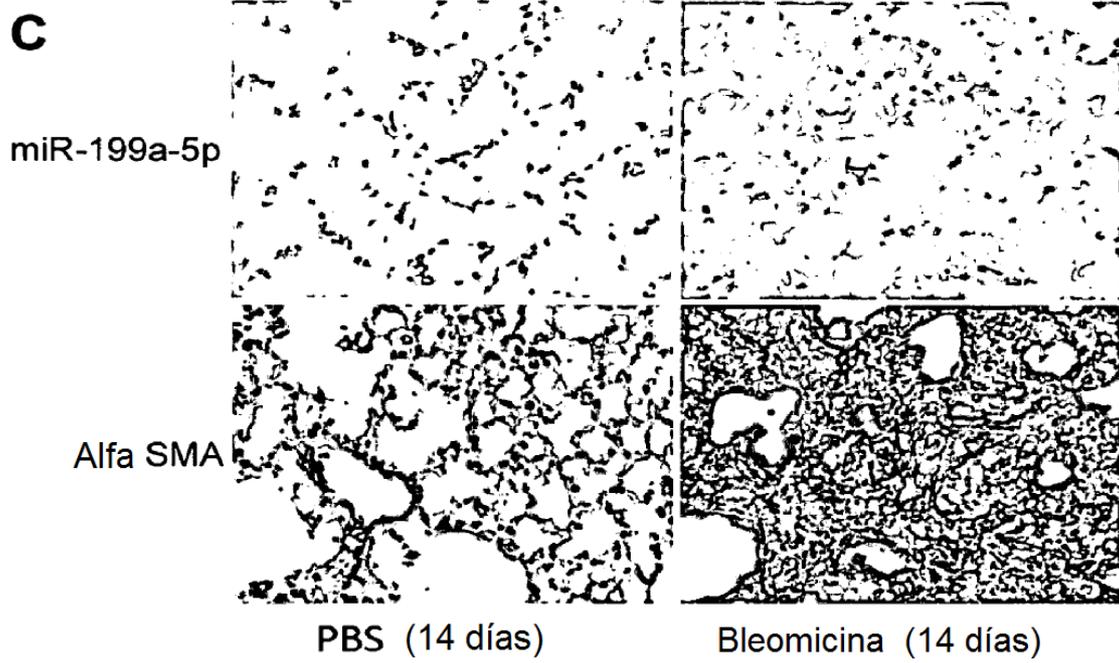


FIGURA 1 (FINAL)

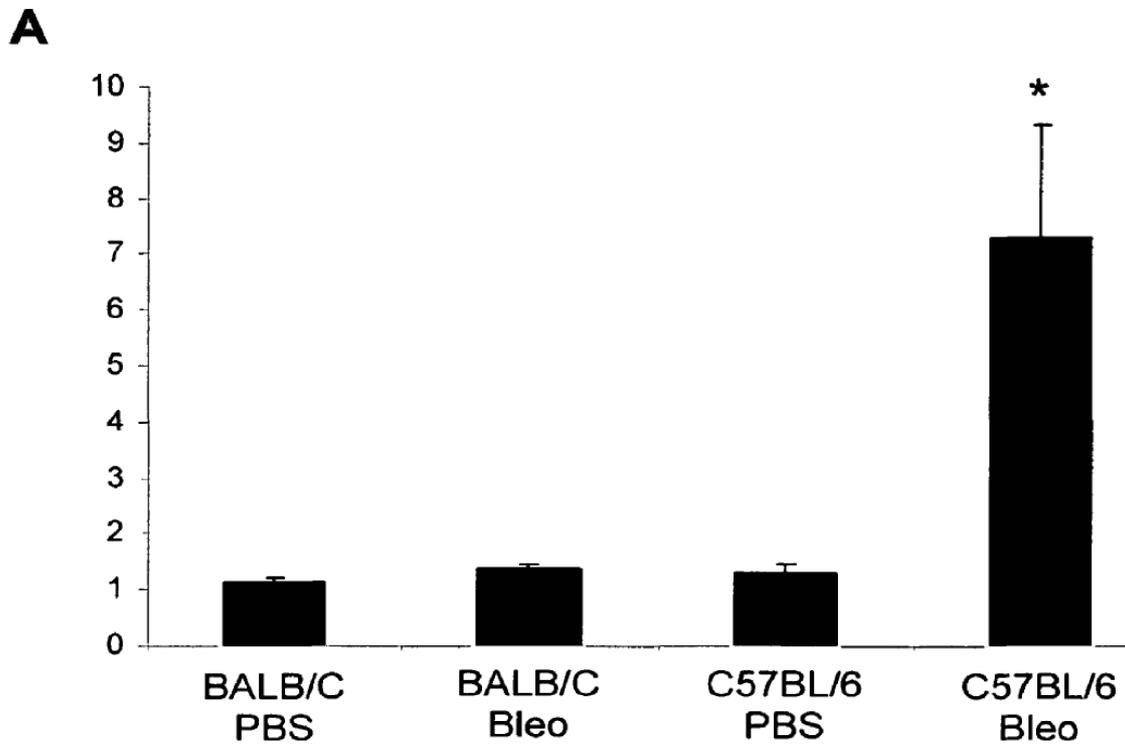


FIGURA 2

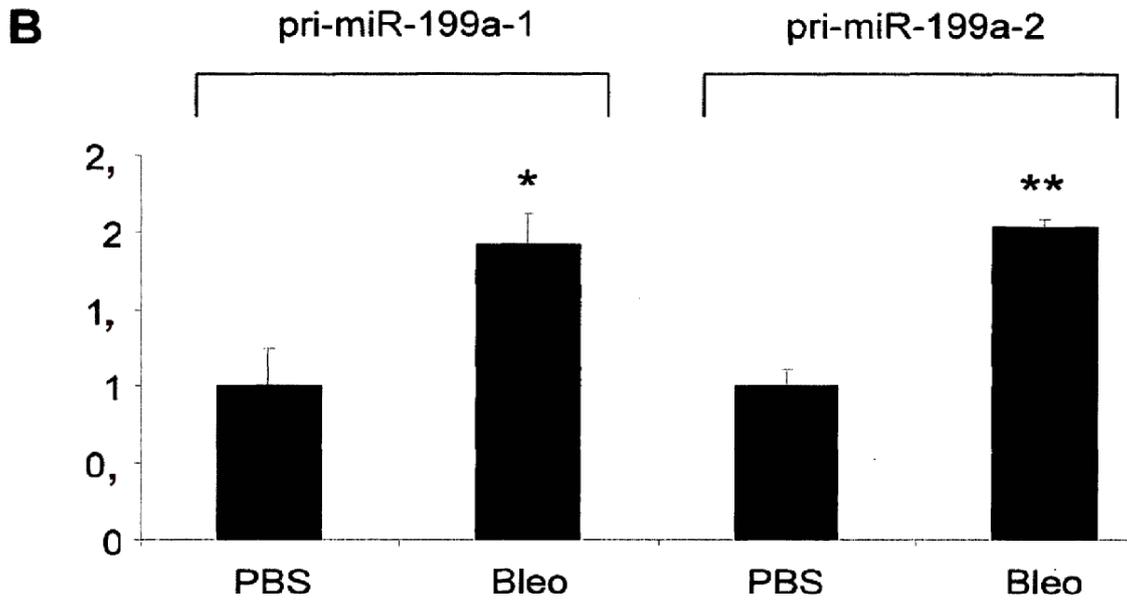


FIGURA 2 (FINAL)

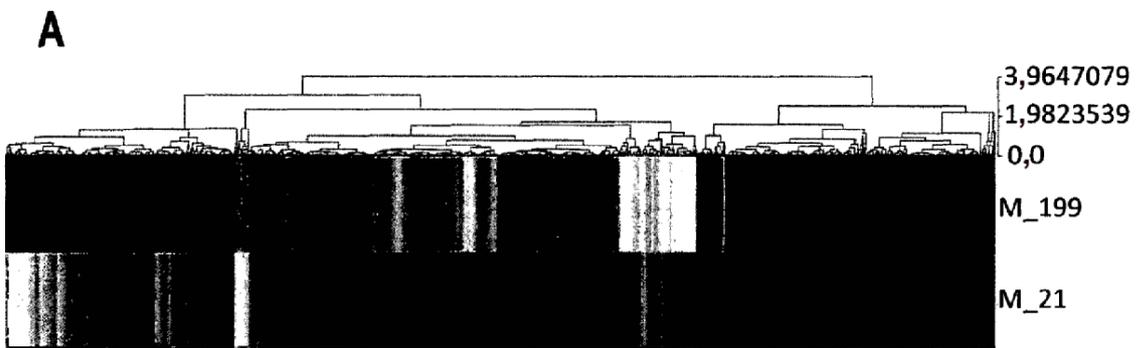
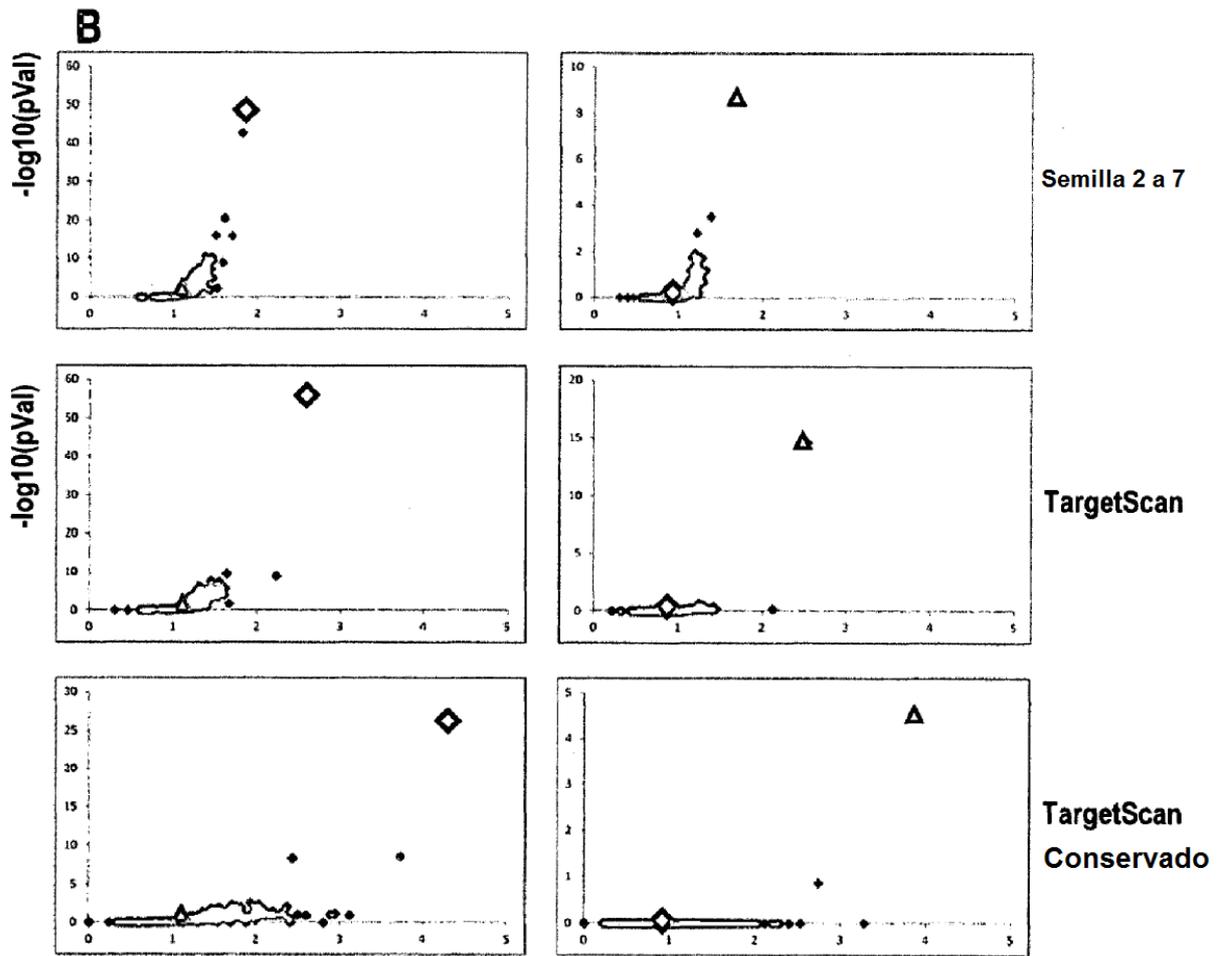


FIGURA 3



C

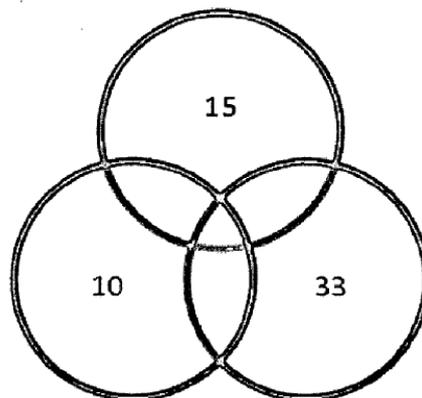


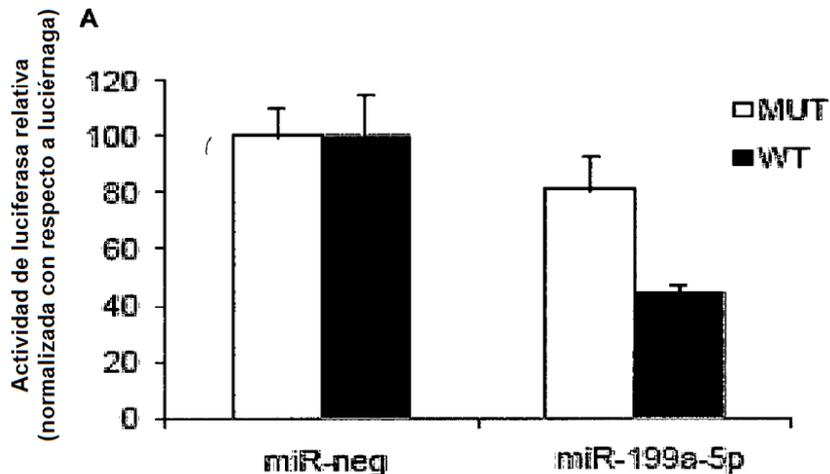
FIGURA 3 (FINAL)

Rutas canónicas Ingenuity	miR-199-5p	miR-21
Señalización de respuesta de fase aguda	2,39	ns
Señalización mediada por April	2,52	ns
Señalización de ATM	ns	4,69
Biosíntesis de esteroides	6,94	ns
Señalización de endocitosis mediada por caveolas	1,46	ns
Control de ciclo celular de replicación cromosómica	ns	6,84
Ciclo celular: regulación de punto control G1/S	4,06	3,71
Ciclo celular: regulación del punto de control G2/M de daño de ADN	ns	7,71
Regulación de ciclina de ciclo celular	3,03	6,55
Señalización de receptor de mortalidad	1,74	1,21
Reparación de rotura de recombinación homóloga de doble cadena	ns	2,86
Metabolismo de ácidos grasos	1,31	ns
Señalización de GNRH	1,74	ns
Señalización de IL-1	2,63	ns
Señalización IL-10	2,13	ns
Señalización de IL-12 y producción en macrófagos	2,28	ns
Señalización de IL-15	1,59	ns
Señalización de IL-17A en células respiratorias	2,16	ns
Señalización de IL-17A en fibroblastos	ns	2,75
Señalización de IL-6	1,89	ns
Señalización de integrina	1,87	ns
Señalización de MAPK estimulada por LPS	2,45	ns
Reparación de desapareamiento en eucariotas	ns	3,96
Papeles mitóticos de la quinasa de tipo polo	1,22	9,15
Mecanismos moleculares de cáncer	1,74	1,41
Señalización de NF-κB	3,03	ns
Señalización de Nur77 en linfocitos T	1,57	ns
Señalización de MAPK p38	2,79	ns
Señalización de p53	1,78	ns
Biosíntesis de pantotenato y CoA	1,71	ns
Señalización de enfermedad de Parkinson	2,04	ns
Señalización de fosfolipasa C	1,57	ns
Señalización de PKC en linfocitos T	2,12	ns
Señalización de PPAR	1,53	ns
Producción de NO y ROS en macrófagos	1,68	ns
Ruta de ubiquinación de proteínas	ns	1,50
Señalización de PTEN	2,70	ns
Metabolismo de purina	1,69	ns
Metabolismo de pirimidina	1,52	1,19
Papel de BRCA1 en la respuesta a daño de ADN	ns	5,61
Papel de proteínas CHK en el control del punto de control del ciclo celular	ns	6,07

FIGURA 4

Rutas canónicas Ingenuity	miR-199-5p	miR-21
Papel de las quinasas de la familia JAK en la señalización citocinas de tipo IL-6	1,60	ns
Papel de NFAT en la hipertrofia cardíaca	2,65	ns
Papel de PKR en la inducción de interferón y respuesta antivírica	1,68	ns
Señalización de SCLC	2,45	2,22
Señalización de TGF-β	2,22	1,41
Señalización de TWEAK	2,04	1,07
Señalización de Diabetes mellitus de tipo I	1,82	ns
Señalización de Diabetes mellitus de tipo II	2,14	ns
Degradación de valina, leucina e isoleucina	1,56	ns
Señalización de Wnt/β-catenina	2,41	ns

FIGURA 4 (FINAL)



```

Humana 5' ACU UUU UGC AUU UAA AAC AGA CAC UGG CAU 3' SEQ.ID NO: 10
Ratón 5' AUU GUU UGC AUU UAA AAC AGA CAC UGG CAU 3' SEQ.ID NO: 11
Rata 5' AUU GUU CCC AUU UGA AAC AGA CAC UGG CAU 3' SEQ.ID NO: 12
          | | | | |
          3' C UUG UCC AUC AGA CUU GUG ACC C 5' SEQ.ID NO: 13
    
```

FIGURA 5

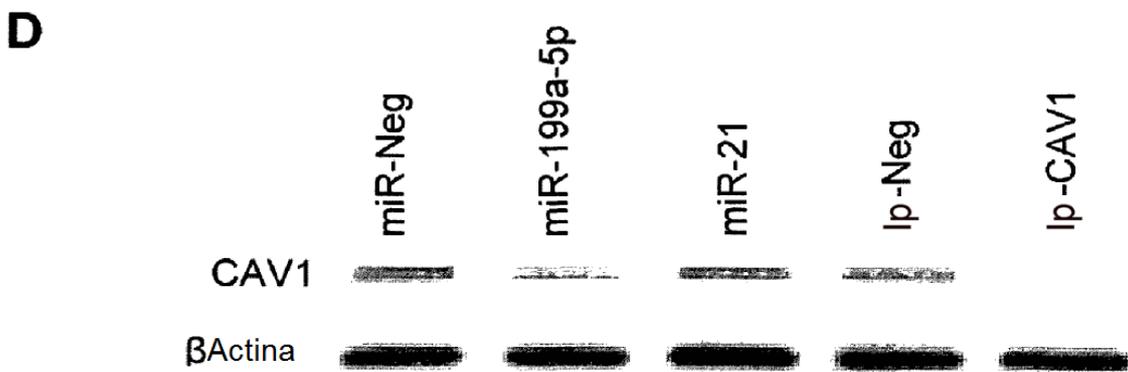
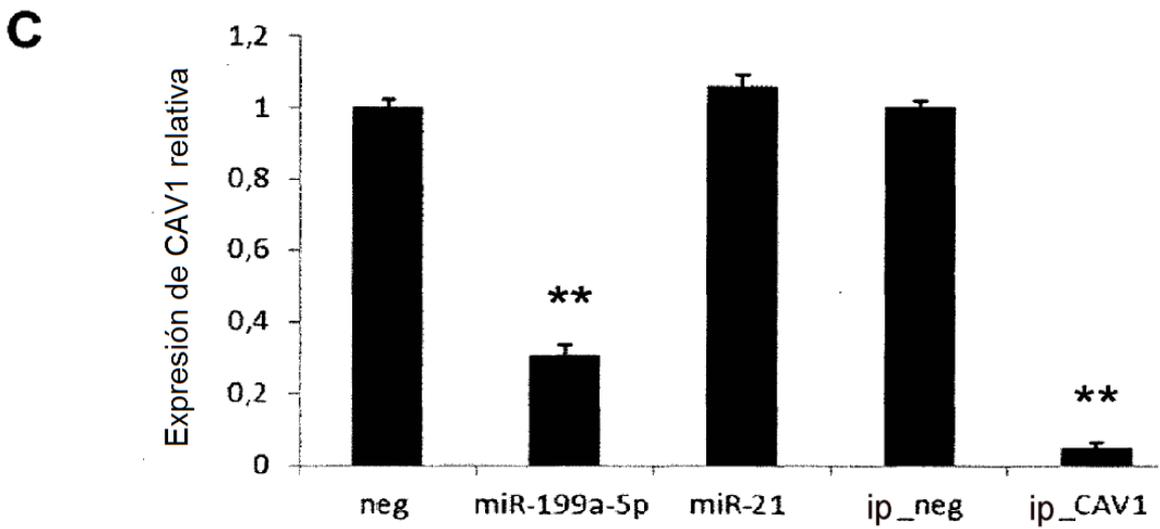
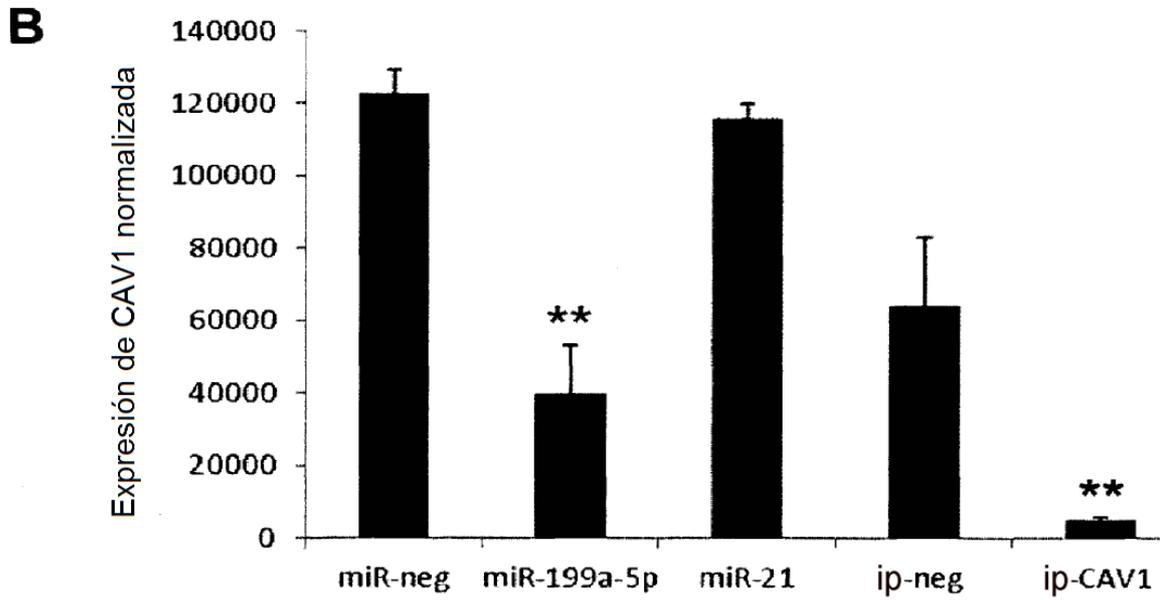


FIGURA 5 (FINAL)

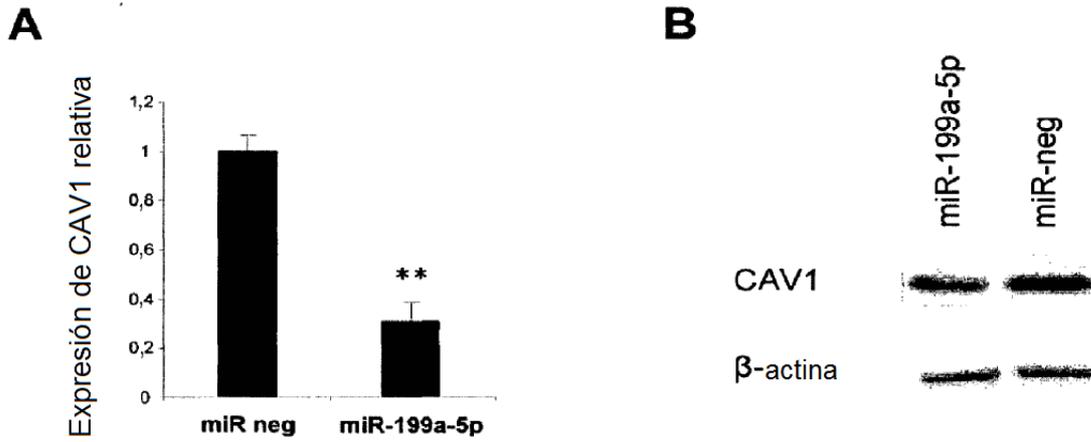


FIGURA 6

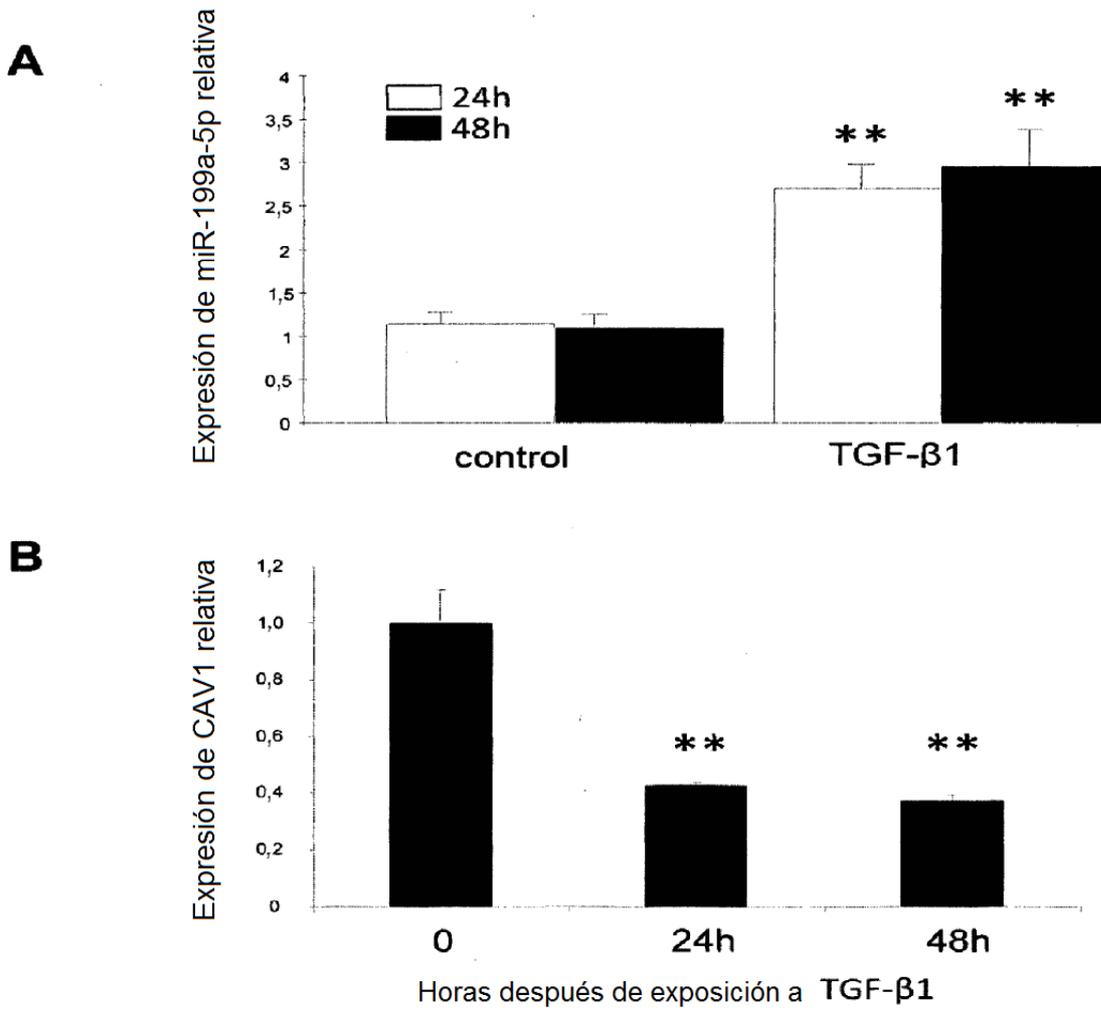


FIGURA 7

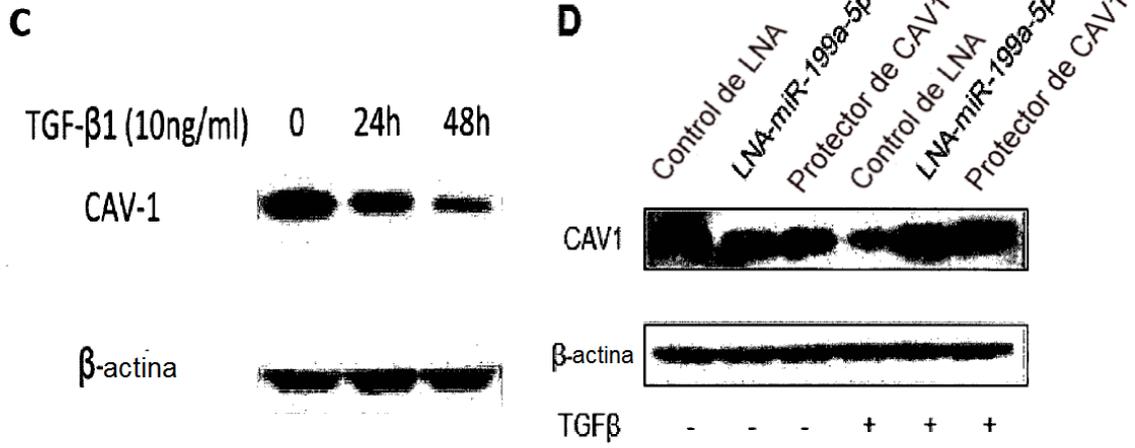


FIGURA 7 (FINAL)

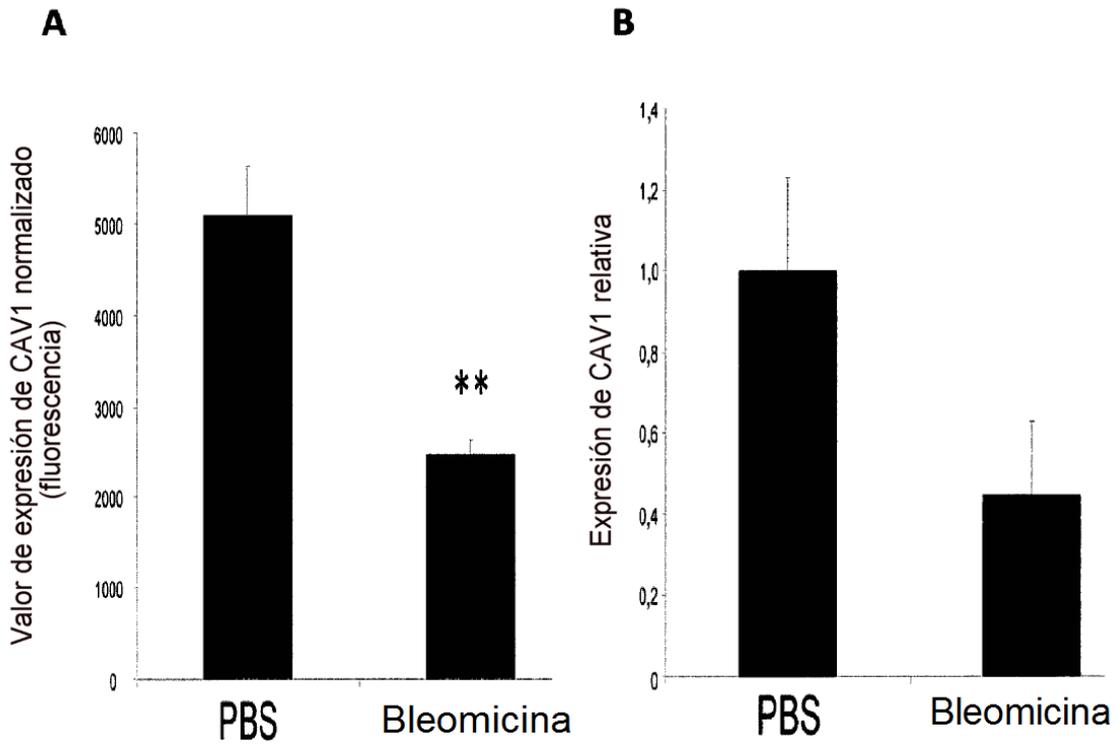
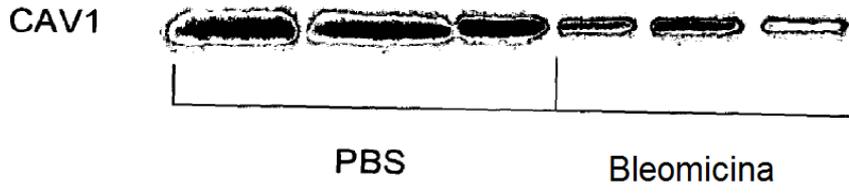


FIGURA 8

C



D

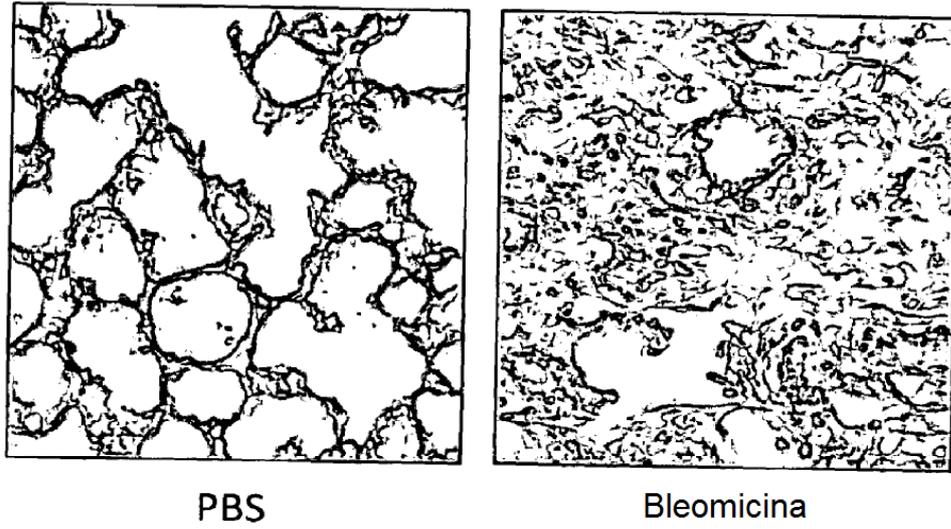


FIGURA 8 (FINAL)

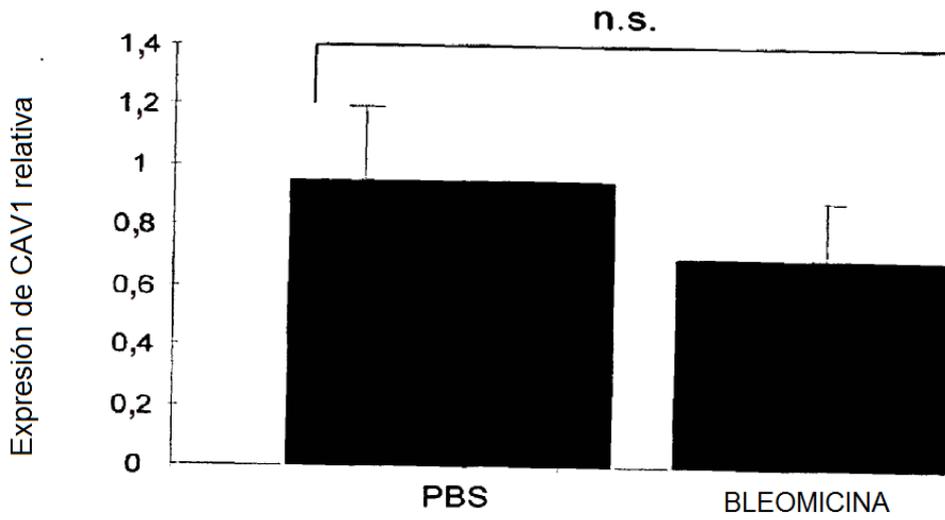


FIGURA 9

Símbolo génico	Fibroblastos de pulmón transfectados con miR-199a-5p			Fibrosis pulmonar inducida por bleomicina		
	Intensidad promedio	Relación logarítmica	P-valor	Intensidad promedio	Relación logarítmica	P-valor
ADAMTS4	10,87	0,77	0,037205	9,02	3,17	0,000044
AKAP7	9,57	-1,59	0,002165	12,05	-1,07	0,001094
ANAPC13	12,52	-1,22	0,001805	15,47	-0,47	0,034385
AOX1	11,46	-1,69	0,000211	12,48	-0,98	0,001395
ARAP3	11,96	-0,70	0,027772	10,49	-1,28	0,000042
ARHGAP12	11,29	-2,00	0,010078	10,52	-0,85	0,000414
ASGR1	9,08	-0,99	0,012113	9,12	-3,12	0,000005
ASPH	13,01	-1,43	0,029179	12,21	-0,44	0,002034
ATP9A	13,11	-1,20	0,008302	16,02	-0,36	0,049043
BTRC	9,16	-1,39	0,004120	10,11	-0,54	0,014927
CABYR	10,57	0,94	0,041231	7,21	1,32	0,003024
CACNB3	10,68	0,72	0,048016	10,44	0,97	0,000449
CAV1	15,73	-1,71	0,005572	11,76	-1,03	0,002899
CAV2	12,60	-0,92	0,025258	14,01	-1,20	0,001986
CCNA2	11,73	0,94	0,022863	10,95	2,20	0,000330
CCNB2	14,79	0,89	0,015840	11,52	1,84	0,000200
CDH2	14,14	-1,96	0,000123	10,48	-0,54	0,027403
CDKN1B	11,99	-0,84	0,018487	13,08	-0,90	0,017326
CDKN3	10,76	0,90	0,026616	8,65	1,88	0,000218
CDT1	12,14	1,00	0,038265	11,65	0,87	0,005190
CENPA	11,43	0,83	0,045218	10,73	1,23	0,003830
CENPH	10,83	1,06	0,011271	8,43	1,71	0,000086
CENPN	13,62	0,76	0,023514	7,52	1,06	0,015405
CHAF1A	13,01	0,91	0,010525	9,30	0,81	0,003431
CHCHD10	11,89	-1,15	0,015618	16,97	-0,92	0,001257
CHTF18	11,97	0,67	0,048768	9,41	1,02	0,014577
CTF1	10,88	-0,69	0,039451	10,65	-0,41	0,025602
CTNND1	10,78	-0,74	0,023539	15,01	-0,72	0,002786
CYB5B	8,30	-0,94	0,023676	13,70	-0,72	0,009805
CYP2S1	7,54	-2,00	0,000431	15,16	-0,79	0,002440
CYTL1	7,96	-1,23	0,008807	11,05	-1,54	0,000494
DALRD3	10,58	-0,86	0,040702	9,06	-0,61	0,037489
DDX58	9,73	-1,72	0,014459	9,22	-0,62	0,035363
DECR1	12,69	-0,79	0,042105	9,29	-0,66	0,015693
EIF2S1	11,42	1,73	0,016695	12,95	0,53	0,029109
ELN	10,94	1,36	0,013629	13,42	3,08	0,000016
ENO3	10,06	-2,23	0,001120	12,35	-0,69	0,009636
ENPP2	9,12	-1,91	0,004048	12,99	-0,41	0,016366
EPAS1	14,26	-2,59	0,000410	13,14	-0,64	0,014242

FIGURA 10

Símbolo génico	Fibroblastos de pulmón transfectados con miR-199a-5p			Fibrosis pulmonar inducida por bleomicina		
	Intensidad promedio	Relación logarítmica	P-valor	Intensidad promedio	Relación logarítmica	P-valor
FAM154B	7,77	-1,06	0,033605	10,21	-0,36	0,035670
FAM20C	12,84	0,87	0,022157	10,69	1,44	0,003179
FSTL1	17,14	1,03	0,017730	15,16	1,96	0,000004
GGCX	10,73	-0,73	0,029469	10,70	-0,96	0,001969
GGT5	7,34	-0,67	0,044755	8,16	-0,93	0,001706
GINS1	12,36	1,10	0,013368	9,69	1,32	0,000611
GINS2	12,70	0,67	0,030172	8,98	1,71	0,000083
GPR20	9,21	2,02	0,000580	7,07	0,95	0,005075
GSTA4	12,11	-0,72	0,016022	11,55	-0,61	0,017292
HDAC6	10,63	1,53	0,000478	10,86	0,63	0,002000
HES6	11,29	1,53	0,016007	12,56	0,73	0,001583
HIP1R	12,29	-1,05	0,007774	9,86	-0,68	0,000640
HMGN3	12,82	0,69	0,048957	11,26	0,72	0,006134
INCENP	10,04	1,31	0,036223	12,30	1,14	0,000272
ING4	10,38	-1,08	0,008163	12,66	-0,41	0,021327
IQSEC2	11,60	-1,04	0,009299	12,44	-0,48	0,022345
KCNN2	12,06	-1,80	0,002929	8,47	-1,22	0,009402
KCTD14	7,07	-0,95	0,039884	9,80	-0,61	0,031442
KIT	9,66	-0,99	0,027587	13,12	-0,88	0,012905
LBH	10,31	1,56	0,002584	12,87	0,72	0,002351
LPCAT2	9,25	0,98	0,037453	7,60	0,90	0,008390
LRRFIP1	11,97	-0,66	0,037696	13,27	-0,54	0,007590
MAGI1	7,52	-1,21	0,024711	9,03	-0,51	0,049757
MAP3K11	13,29	-2,78	0,000346	11,58	-0,56	0,012199
MAP3K5	11,98	-1,80	0,006828	10,00	-0,87	0,006964
MBOAT1	9,75	1,31	0,000828	12,08	0,42	0,014647
MDGA1	9,91	1,90	0,007768	8,10	1,57	0,005156
MEGF6	9,82	-0,87	0,030507	12,14	-1,07	0,000602
NBL1	14,18	-0,93	0,043617	15,72	-0,47	0,022266
NCBP2	11,40	-1,97	0,000828	10,18	-0,45	0,014578
NEDD4L	10,41	-1,28	0,045937	9,60	-1,68	0,001422
NHLRC3	8,90	1,69	0,008096	8,34	0,95	0,000194
NIPAL3	13,11	-1,34	0,001092	13,13	-1,10	0,001203
NUBP1	13,19	0,79	0,038434	13,00	0,98	0,000249
NUSAP1	12,38	0,87	0,019359	9,80	1,60	0,001794
ODF3B	7,27	-0,90	0,025859	13,09	-0,69	0,015031
OTUD3	9,22	1,70	0,012549	11,10	0,72	0,009897
PMEPA1	10,80	0,86	0,013635	13,06	1,49	0,000062
PNKD	7,12	-1,15	0,005612	7,96	-1,08	0,003491
PNPLA6	9,56	-1,63	0,009919	12,37	-0,30	0,047030

FIGURA 10 (CONTINUACIÓN)

Símbolo génico	Fibroblastos de pulmón transfectados con miR-199a-5p			Fibrosis pulmonar inducida por bleomicina		
	Intensidad promedio	Relación logarítmica	P-valor	Intensidad promedio	Relación logarítmica	P-valor
POMGNT1	13,66	-0,88	0,005364	12,08	-0,32	0,023190
PPFIBP2	8,82	-0,75	0,032615	13,05	-0,80	0,015070
PPP2R3C	13,91	0,86	0,033926	11,45	0,53	0,025985
PRC1	14,41	0,84	0,004102	11,18	1,78	0,000124
PRELID2	9,33	0,99	0,042979	9,99	0,56	0,005315
PRICKLE1	11,41	-1,22	0,005224	14,07	-1,42	0,000180
PRMT2	10,05	-0,66	0,047910	14,01	-0,67	0,030405
PRPS2	8,02	-0,95	0,041219	10,22	-0,91	0,000555
R3HDM2	12,36	-1,23	0,019502	13,32	-0,42	0,017910
RALGAPB	10,47	-1,18	0,023239	12,96	-0,47	0,009014
RASGRP2	8,06	-1,37	0,009020	12,24	-0,60	0,004782
RBM24	9,47	-2,59	0,000360	9,44	-0,27	0,039708
REEP5	13,48	-2,17	0,002005	12,55	-0,42	0,025985
RGMB	9,81	-0,75	0,028634	11,30	-0,87	0,005668
RNASEH2A	13,07	0,75	0,036633	10,81	0,49	0,048594
RNF141	11,52	-1,54	0,015631	12,99	-0,67	0,001122
ROBO4	7,54	-1,65	0,011311	14,51	-0,67	0,011915
RRM2B	9,58	-2,97	0,001651	8,51	-0,62	0,006787
RTCD1	14,33	1,38	0,004627	12,19	0,52	0,007499
SELENBP1	12,64	-0,81	0,016828	17,28	-0,45	0,040980
SGIP1	8,80	-1,31	0,012026	8,65	-0,62	0,019749
SH3D19	12,72	-1,29	0,008996	9,60	-0,91	0,013287
SIRT5	10,40	-1,13	0,011311	11,21	-0,51	0,013278
SKA1	9,70	1,02	0,006580	8,56	1,79	0,000316
SLC2A6	11,76	0,89	0,014990	10,92	0,71	0,019866
SLC39A14	13,51	0,96	0,017472	11,15	2,02	0,000197
SLC40A1	8,90	1,32	0,021215	10,64	0,92	0,000270
SMARCC2	14,23	-0,64	0,032899	9,83	-0,54	0,018426
SMS	15,75	-1,76	0,017748	10,87	-0,87	0,000163
SMURF2	8,88	-1,23	0,013799	10,89	-0,83	0,000156
SOCS1	13,01	1,67	0,000297	10,87	0,60	0,009453
SORL1	9,72	-1,50	0,000718	11,34	-1,06	0,002206
SPC25	11,97	1,35	0,015518	11,39	2,26	0,000033
SPON2	15,60	-0,80	0,025019	12,53	-1,24	0,011622
SREBF2	11,51	1,25	0,001645	10,32	1,35	0,000207
STX3	8,69	-1,21	0,024221	8,72	-1,13	0,000179
SYNGR1	9,53	-1,37	0,008975	7,11	-0,46	0,043806
TCEAL1	11,86	-0,91	0,018668	10,23	-0,63	0,041974
TDG	13,68	0,99	0,033435	8,30	0,43	0,029690
TGFB3	8,06	1,00	0,010858	13,52	0,81	0,007305

FIGURA 10 (CONTINUACIÓN)

Símbolo génico	Fibroblastos de pulmón transfectados con miR-199a-5p			Fibrosis pulmonar inducida por bleomicina		
	Intensidad promedio	Relación logarítmica	P-valor	Intensidad promedio	Relación logarítmica	P-valor
TGFBR1	8,50	1,74	0,007822	12,40	0,56	0,005692
THBD	7,77	-1,61	0,012078	15,29	-1,22	0,034879
THBS3	10,56	-0,67	0,030059	13,75	-1,70	0,000072
TMEM159	12,32	-1,33	0,001835	12,14	-0,46	0,046713
TMEM164	11,32	-1,95	0,000495	13,69	-0,49	0,020506
TMEM20	7,65	0,85	0,027311	9,65	0,61	0,024024
TMEM45A	12,57	1,09	0,027911	11,66	1,14	0,002854
TRAIP	11,29	1,01	0,039309	8,71	1,42	0,005390
TRAK1	11,44	-1,45	0,032442	7,15	-0,33	0,034043
TSPAN13	7,88	-1,12	0,045464	15,27	-1,74	0,000216
TST	14,12	-2,01	0,000099	12,60	-0,86	0,001296
TTC39C	8,78	0,82	0,025257	10,00	1,44	0,017367
UBE2V1	13,50	2,19	0,000423	10,54	0,40	0,038237
WASFI	12,40	0,65	0,031618	8,51	0,41	0,049891

FIGURA 10 (FINAL)

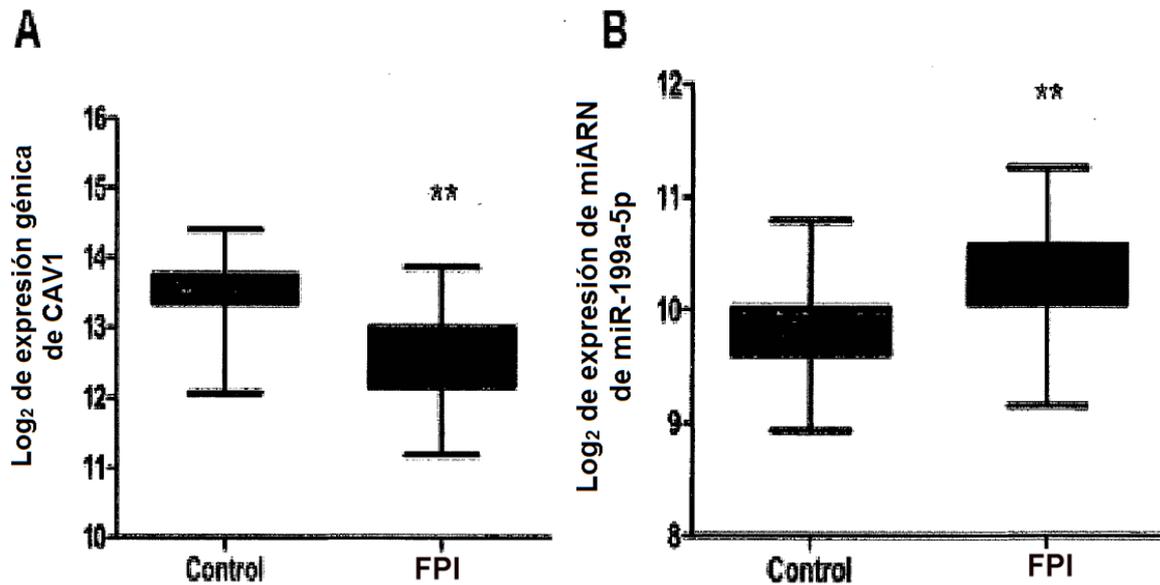


FIGURA 11

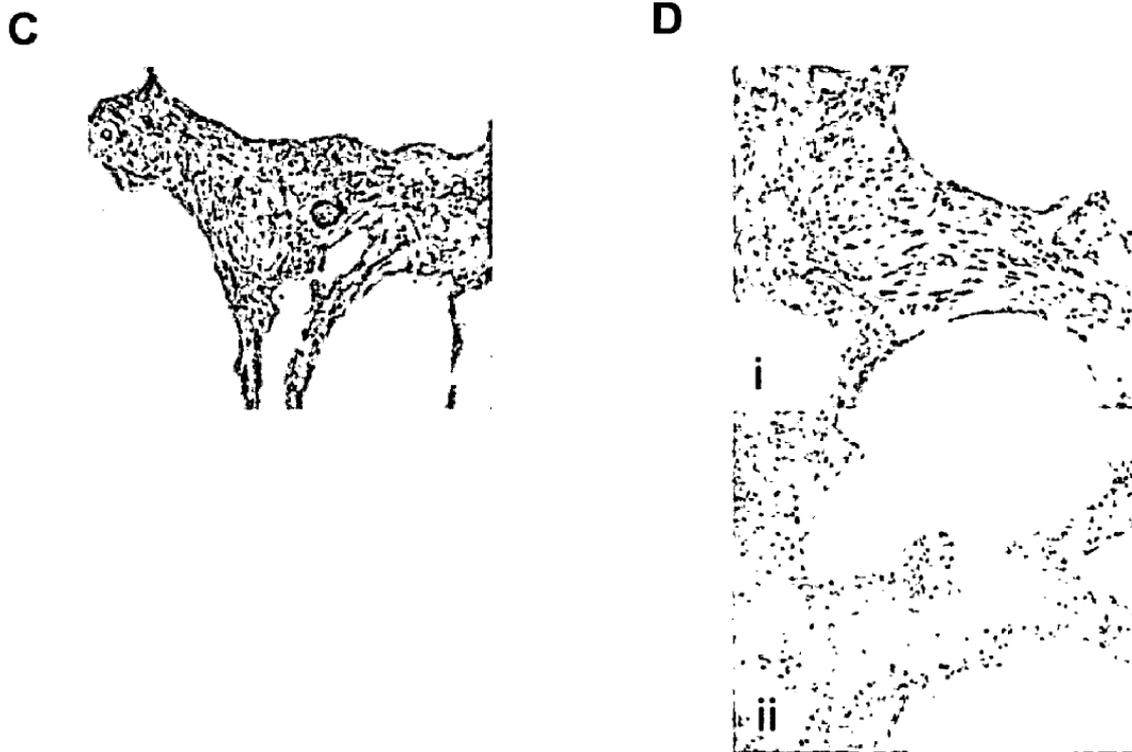


FIGURA 11 (FINAL)

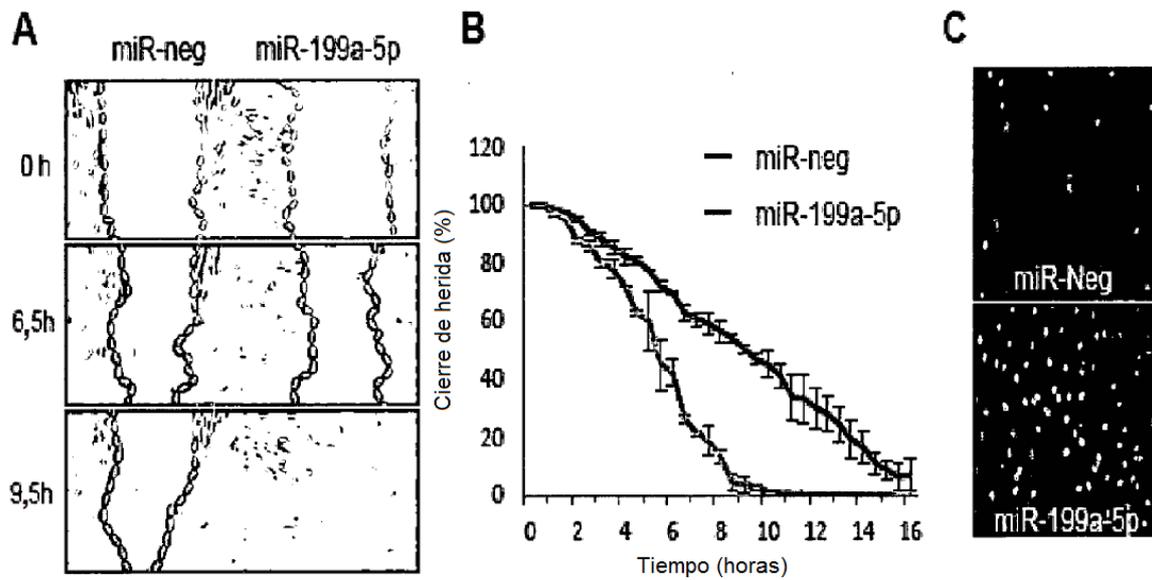


FIGURA 12

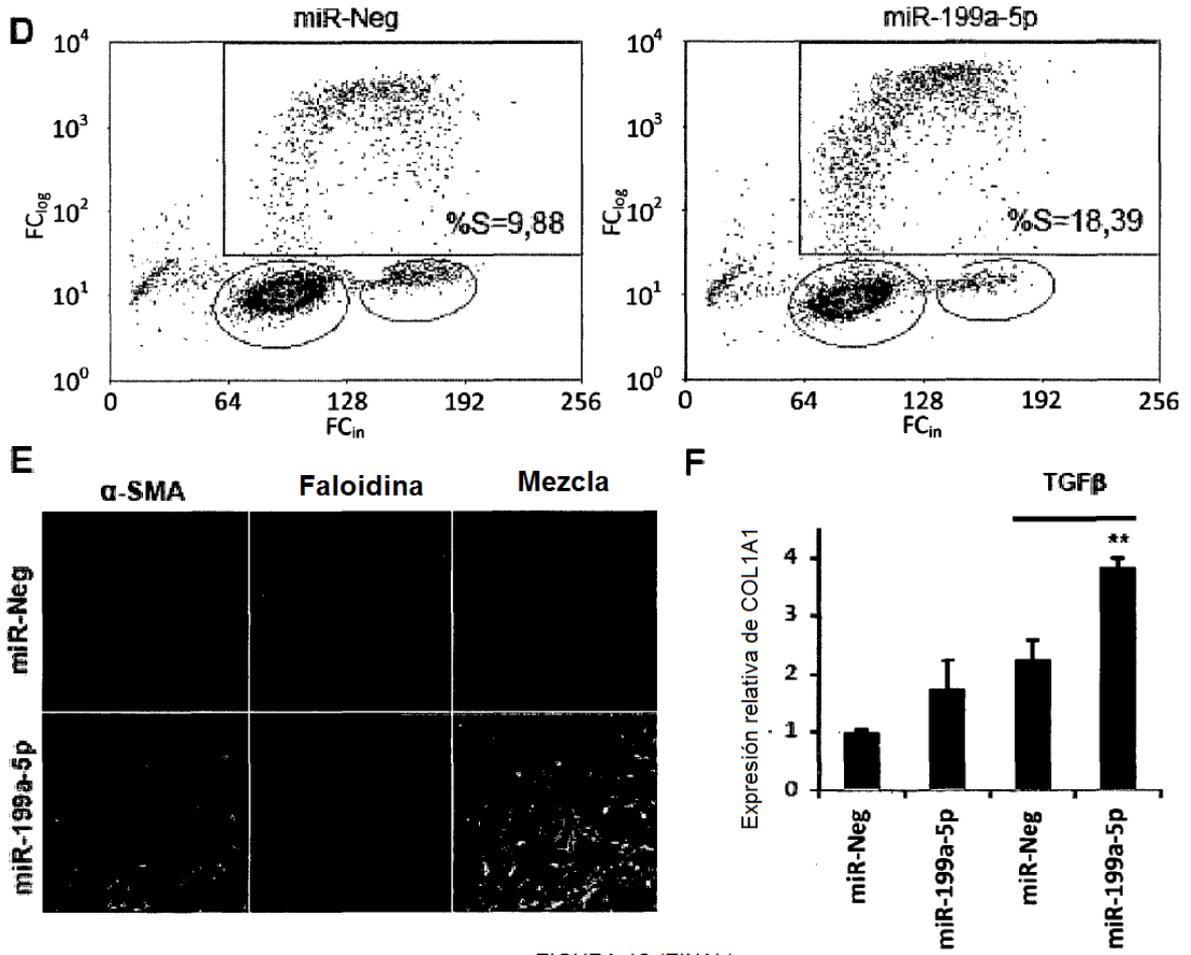


FIGURA 12 (FINAL)

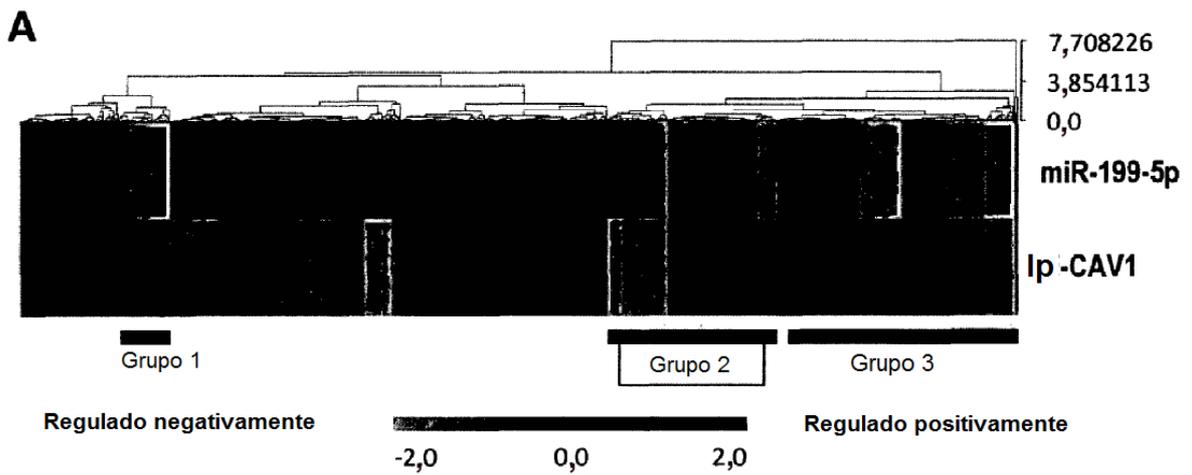


FIGURA 13

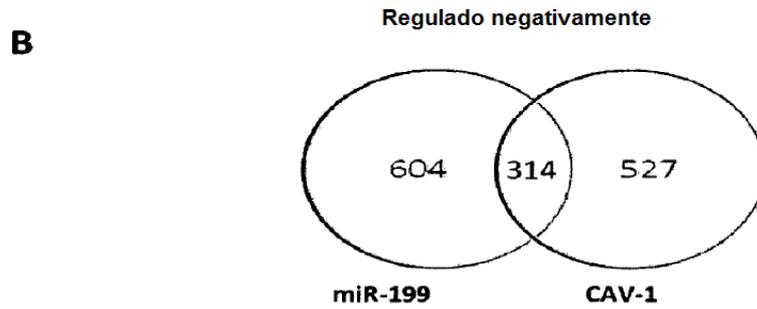


FIGURA 13 (FINAL)

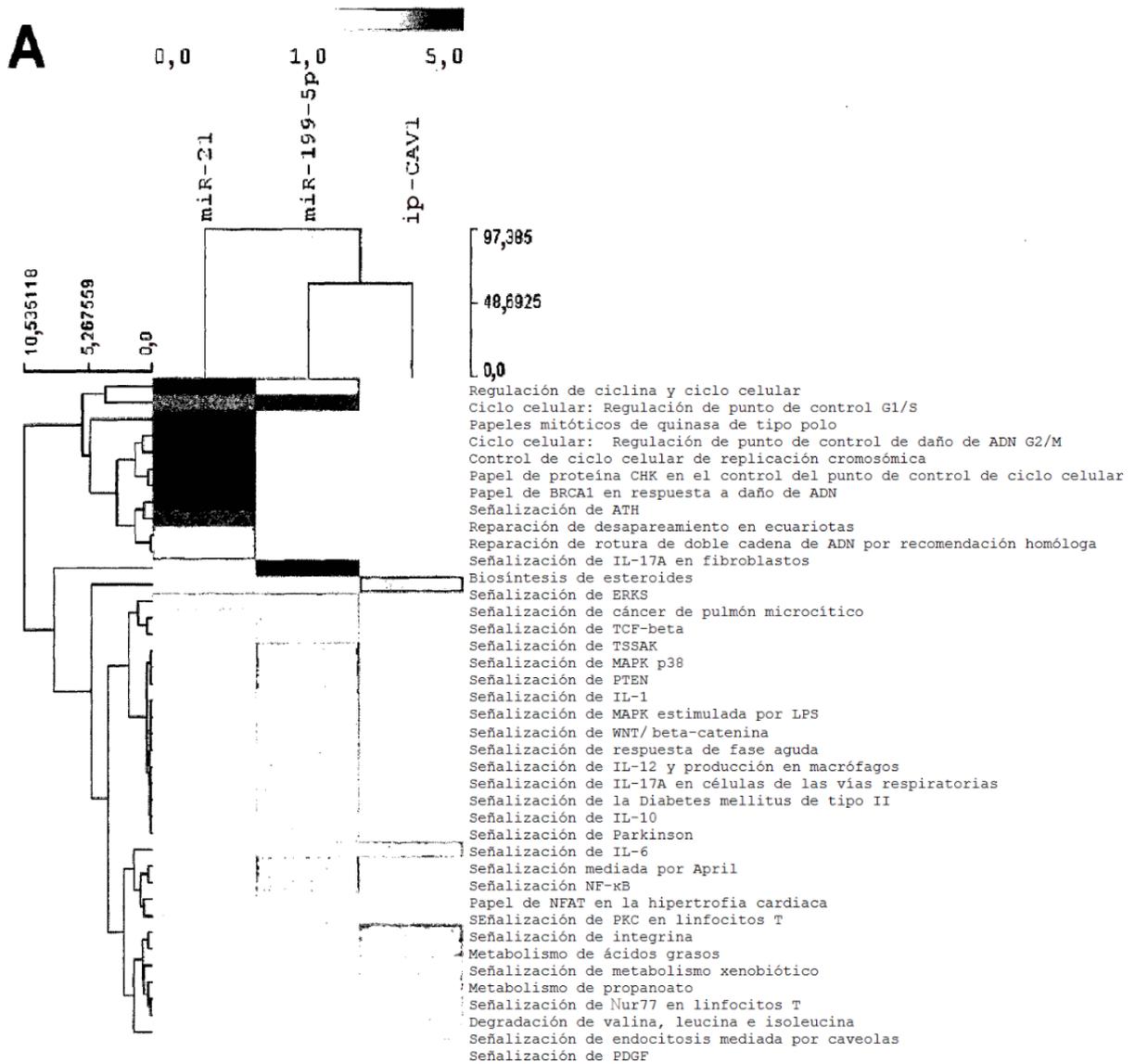
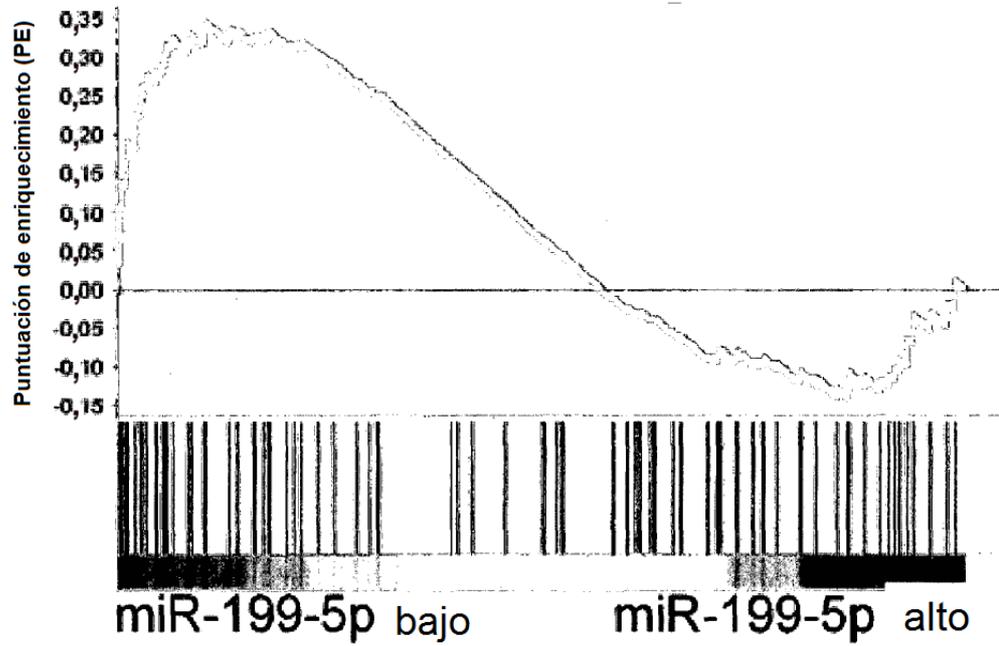


FIGURA 14

B

Puntuación de enriquecimiento: TGF regulado positivamente



Puntuación de enriquecimiento: TGF regulado negativamente

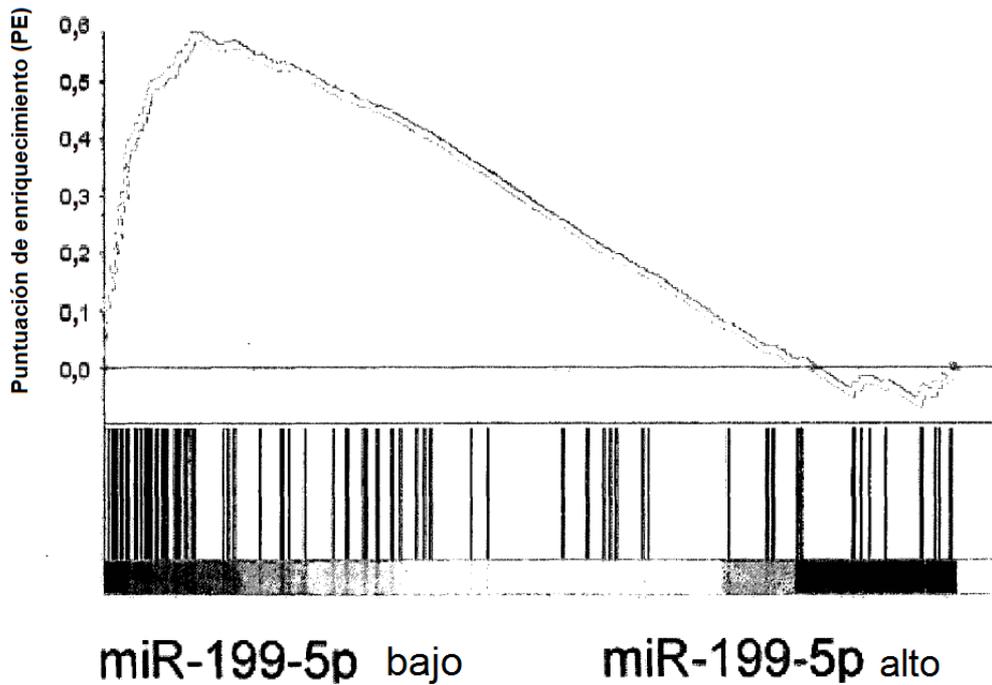


FIGURA 14 (CONTINUACIÓN)

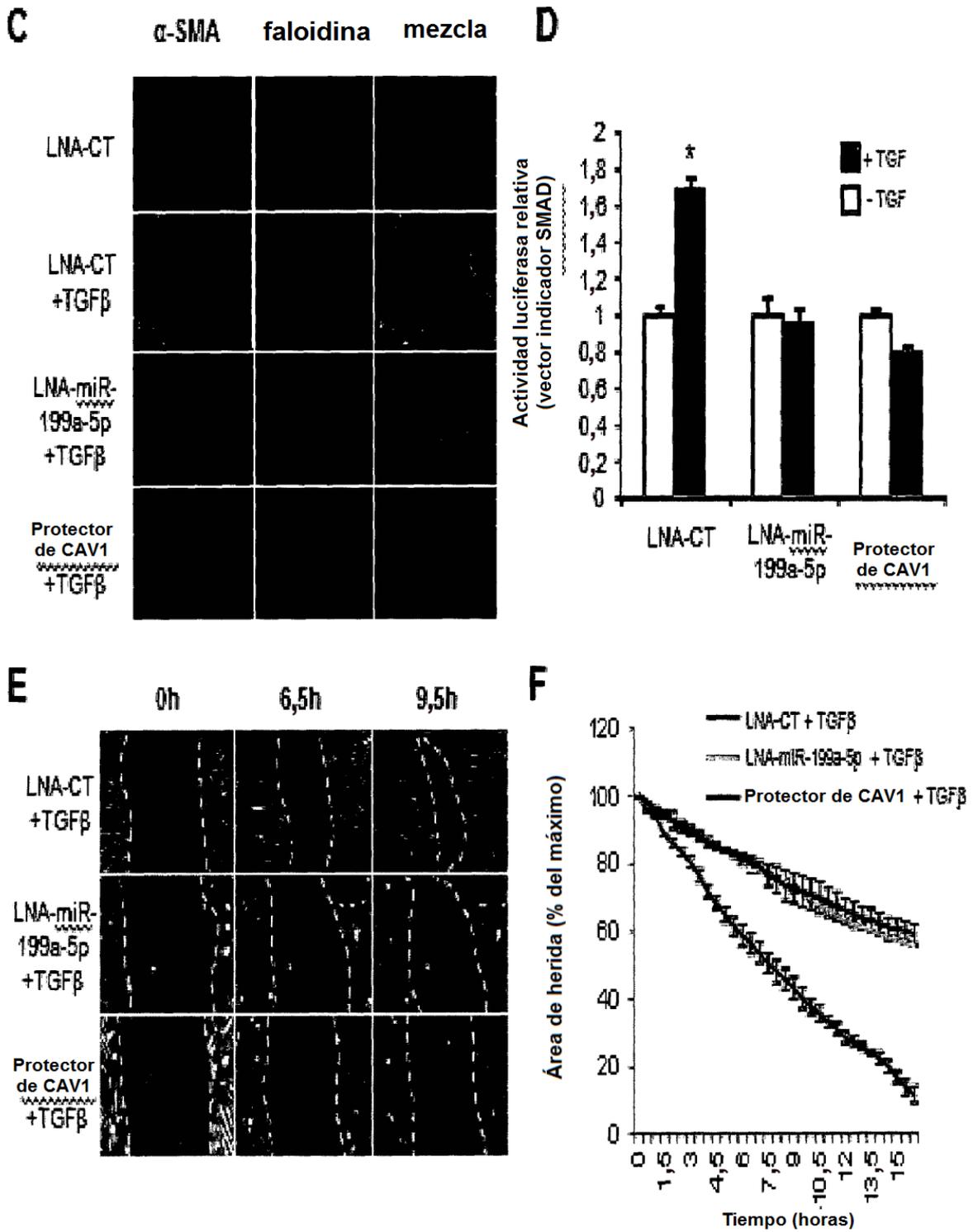


FIGURA 14 (FINAL)

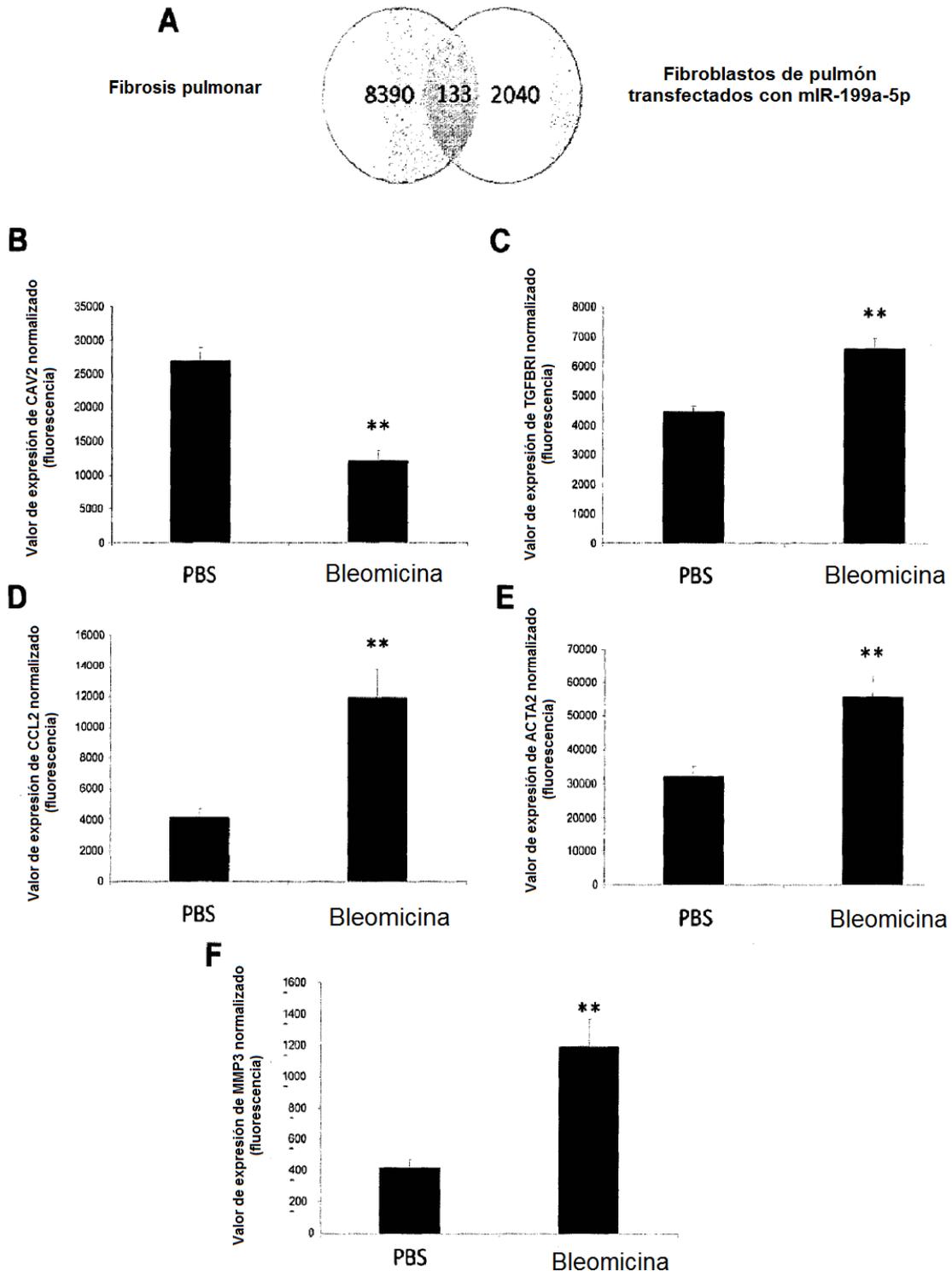


FIGURA 15

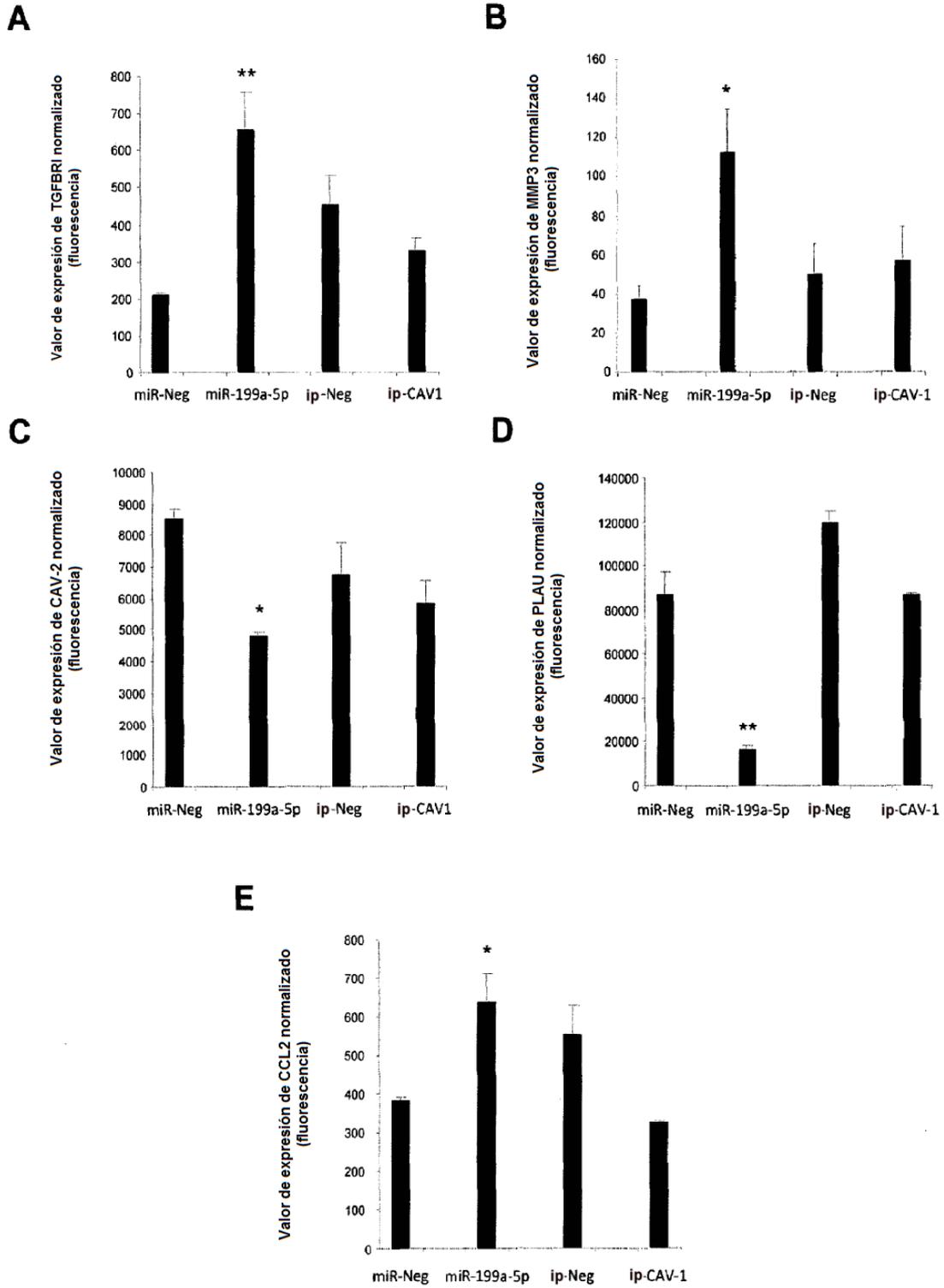


FIGURA 16

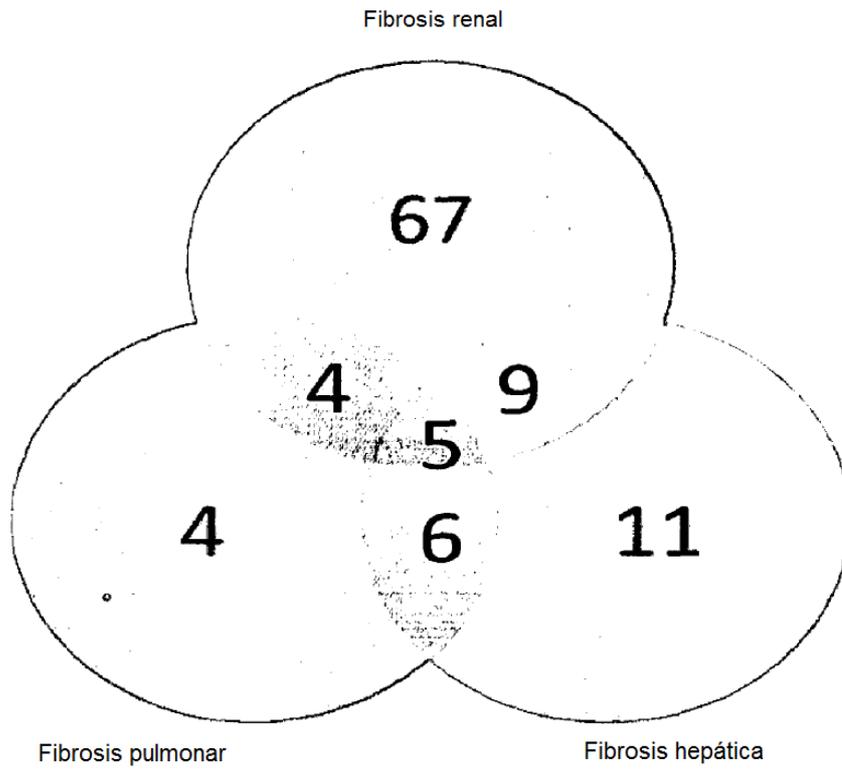


FIGURA 17

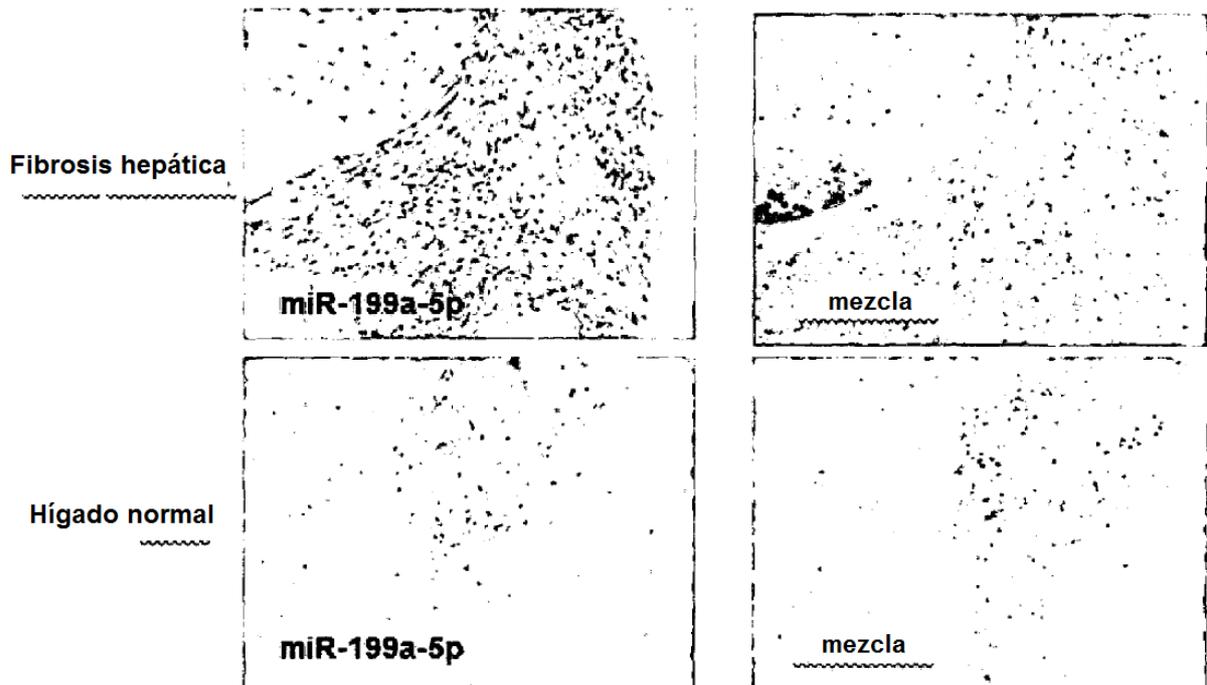


FIGURA 18

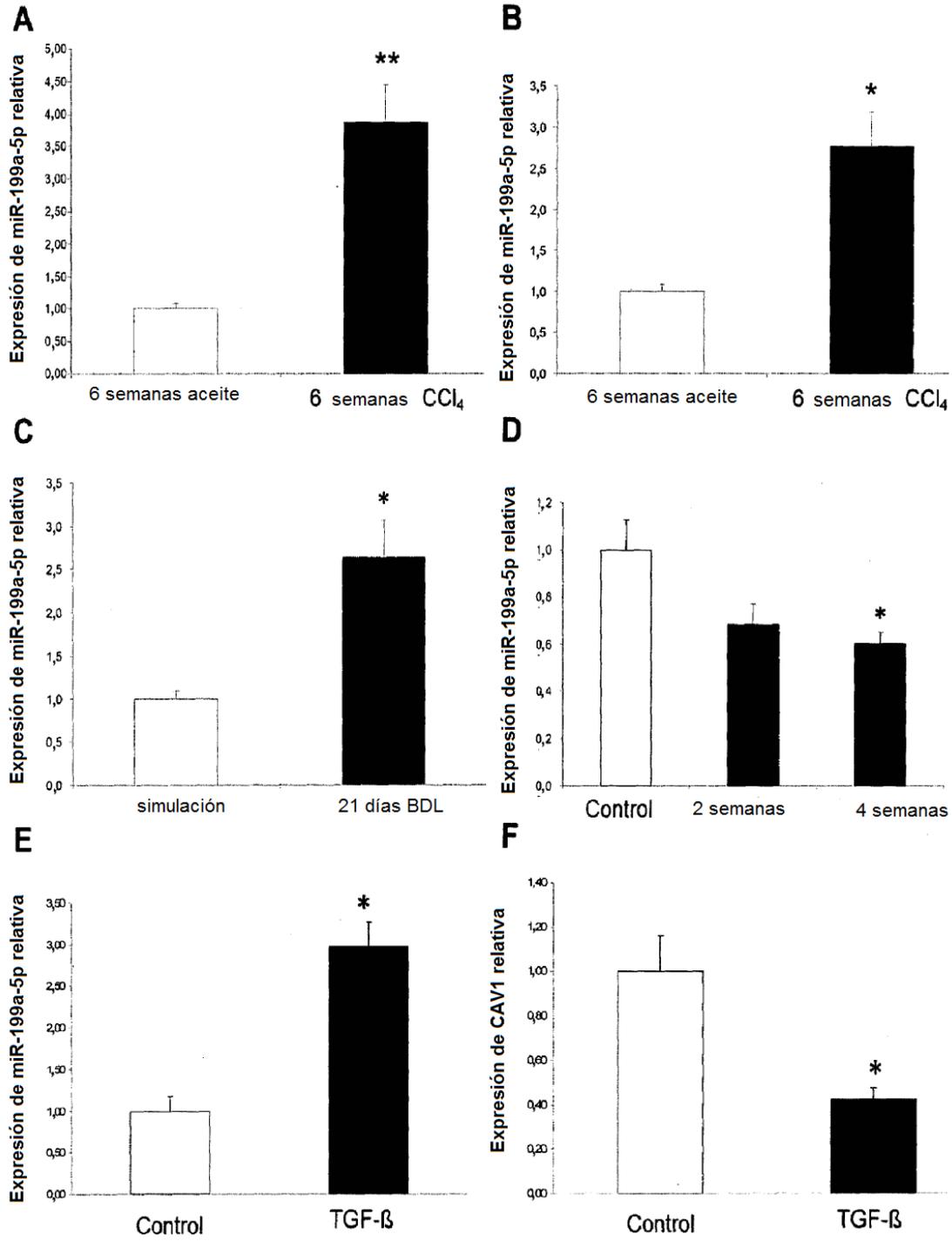
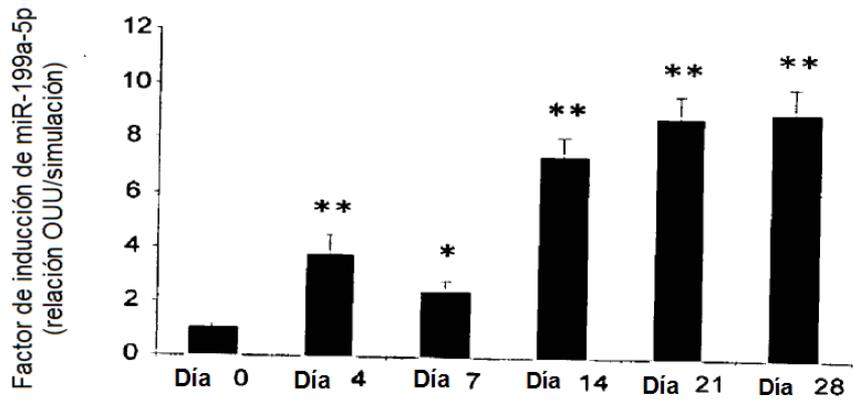
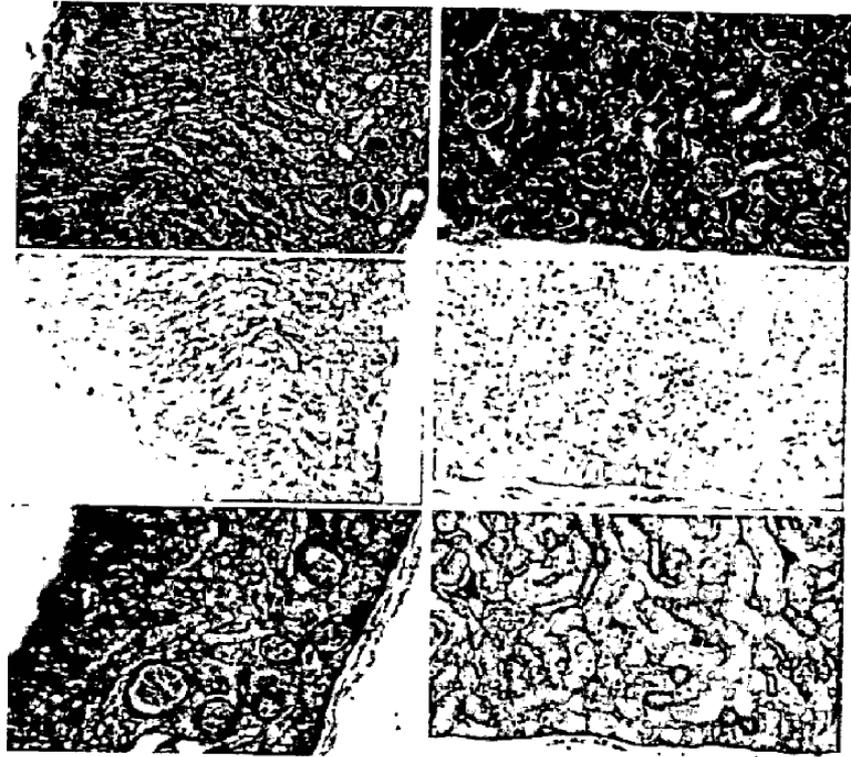


FIGURA 19

A



B



C

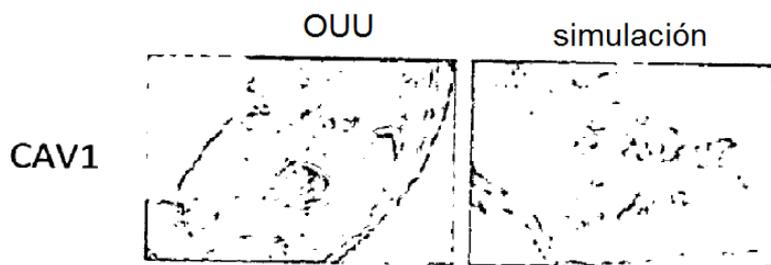


FIGURA 20