(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 651 515**

(51) Int. CI.:

***C12N 15/113*** (2010.01)
***A61K 31/7088*** (2006.01)
***A61K 31/713*** (2006.01)
***C12Q 1/68*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.09.2012 PCT/EP2012/067443**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013 WO13034653**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2012 E 12758827 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2753696**

(54) Título: **La familia miARN-212/132 como diana terapéutica**

(30) Prioridad:

**06.09.2011 US 201161531156 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**26.01.2018**

(73) Titular/es:

**MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. (50.0%)**
**Hofgartenstrasse 8**
**80539 München, DE y**
**MEDIZINISCHE HOCHSCHULE HANNOVER (50.0%)**

(72) Inventor/es:

**THUM, THOMAS;**
**CHOWDHURY, KAMAL;**
**UCAR, AHMET y**
**GUPTA, SHASHI KUMAR**

(74) Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

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

La familia miARN-212/132 como diana terapéutica

La presente invención se refiere a inhibidores de microARN miR-132 para su uso en medicina, particularmente en el tratamiento o prevención de trastornos cardíacos, por ejemplo, trastornos asociados a hipertrofia cardíaca o autofágicos.

la invención se refiere adicionalmente a moléculas aisladas de ácido nucleico de microARN miR-132 y secuencias relacionadas para su uso en medicina, particularmente en medicina humana, más particularmente en el diagnóstico, tratamiento o prevención de trastornos que implican atrofia cardíaca y/o autofagia disfuncional, por ejemplo, caquexia cardíaca.

La insuficiencia cardíaca es una de las causas patológicas que dan lugar a mortalidad en el mundo. Las opciones farmacológicas terapéuticas que se utilizan actualmente para la insuficiencia cardíaca incluyen agentes moduladores de angiotensina, β-bloqueantes, diuréticos, antagonistas de aldosterona, vasodilatadores, o agentes inotrópicos. Aunque varios estudios clínicos han demostrado disminuciones significativas de las tasas de mortalidad inducidas por la insuficiencia cardíaca para todos estos agentes, la tasa de mortalidad a los 5 años permanece de manera inaceptable a casi el 50 %. Por lo tanto existe una urgencia en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas más eficaces para la insuficiencia cardíaca.

El crecimiento hipertrófico patológico de los cardiomiocitos puede dar lugar al desarrollo de remodelación cardíaca, insuficiencia cardíaca y muerte cardíaca repentina. El crecimiento hipertrófico de los cardiomiocitos es una repuesta al aumento de la tensión de la pared cardíaca producida por una sobre carga del volumen cardíaco y/o la presión. Inicialmente, la hipertrofia cardíaca es un mecanismo compensatorio con el fin de disminuir la tensión de la pared y aumentar el gasto cardíaco. Sin embargo, la hipertrofia cardiaca prolongada progresa hacia una disfunción contráctil, descompensación cardíaca y finalmente insuficiencia cardíaca (Hill y Olson, 2008; Barry y Townsend, 2010). La transición de la hipertrofia fisiológica a la patológica puede producirse dependiendo de muchos factores que incluyen pérdida de miocitos mediante apoptosis o necrosis, defectos en la respuesta contráctil, homeostasis del calcio desregulada, des-sensibilización de los receptores adrenérgicos, o fibrosis cardíaca (Hill y Olson, 2008; Barry y Townsend, 2010).La señalización de hipertrofia está mediada sobre todo por la ruta de señalización de las insulina (DeBosch y Muslin, 2008; Barry y Townsend, 2010). Tanto la insulina como el factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) activan las rutas pro-hipertróficas en los cardiomiocitos mediante el receptor del IGF-1, que activa la fosfoinositina-3-cinasa (PI3K) (McMullen et al., 2004). La actividad de PI3K da lugar a la activación de la serina/treonina cinasa Akt mediante su fosforilación y la Akt activa fosforila los factores de transcripción FoxO anti-hipertróficos que da lugar a su desestabilización y prevención de la localización nuclear (Datta et al., 1999; Skurk et al., 2005; Ronnebaum y Patterson, 2010). Por el contrario, la acetilación de los factores FoxO mediante la sirtuina -1 (Sirt-1) da lugar a su estabilización y la translocalización nuclear (Frescas et al., 2005). Los factores de transcripción FoxO estabilizados se localizan en el núcleo con el fin de regular la expresión de genes anti-hipertróficos. Las funciones anti-hipertróficas de las proteínas FoxO están mediadas sobre todo mediante la supresión de la ruta de señalización de calcineurina pro-hipertrófica mediante la expresión de genes anti-hipertróficos diana de los factores FoxO, tales como atrogin-1 (Ni et al., 2006; Ronnebaum y Patterson, 2010; Glas, 2010). Además, los factores de transcripción FoxO también inducen apoptosis y regulan la autofagia en cardiomiocitos (Ronnebaum y Patterson, 2010).

La caquexia es una de las consecuencias más visibles y devastadoras de la enfermedad humana que se ven en varias enfermedades crónicas humanas, incluyendo el cáncer, SIDA, tirotoxicosis, y artritis reumatoide (Anker & Coats, 1999). Se pensaba que se relacionaba con la pérdida de apetito (anorexia), anemia, y anormalidades metabólicas. a presencia de pérdida de peso general en los pacientes con insuficiencia cardíaca se ha denominado caquexia cardíaca. Anker & Coats (1999) sugerían que la "*caquexia cardíaca clínica*" se definía como una afección donde exista una pérdida de peso de > 7,5 % en comparación con el peso normal previo durante una duración de al menos seis meses en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica (CHF), que no muestran síntomas de otros estados caquécticos primarios tales como el cáncer, enfermedad tiroidea o enfermedad hepática grave. También se había sugerido una clasificación adicional en caquexia grave (> 15 % de pérdida de peso o > 7,5 % de pérdida de peso y < 85 % del peso corporal ideal) y temprana o moderada (> 7,5 % a <15 % de pérdida de peso y > 85 % de peso corporal ideal) (Anker & Coats (1999).

La detección de caquexia cardíaca, a la que también se hace referencia como atrofia corporal, es un fuerte riesgo independiente de mortalidad en pacientes con CHF, con una tasa de mortalidad a los 18 meses del 50 %, principalmente debido a la ausencia de una terapia específica para pacientes caquécticos con CHF (Anker et al., 1997; Anker& Coats, 1999).

La autofagia es un proceso catabólico, que se inicia con la limitación de nutrientes, estrés celular, especies reactivas a oxígeno (ROS), o la acumulación de orgánulos dañados o agregados proteicos. El papel de la autofagia en el mantenimiento de la homeostasis cardíaca se evaluó recientemente (Gottlieb y Mentzer, 2010). Por ejemplo, la eliminación autofágica de orgánulos dañados, especialmente la mitocondria es crucial para la función cardíaca

apropiada, mientras que la actividad autofágica exagerada puede fomentar el desarrollo de la insuficiencia cardíaca (Gottlieb y Gustafsson, 2011). La degradación autofágica intensificada puede dar lugar a la muerte celular autofágica, que se diferente de la apoptosis ya que no necesita la activación de la caspasa (Ronnebaum y Patterson, 2010). Por lo tanto, un delicado equilibrio de la autofagia mantiene la homeostasis cardíaca, mientras que el desequilibrio da lugar a la progresión de la insuficiencia cardíaca (Cao et al., 2011).

Los microARN (miARN) son moléculas de ARN pequeñas que regulan la expresión genética de sus genes diana a niveles post-transcripcionales. Mediante su regulación directa sobre estos genes diana, los microARN pueden regular varis procesos biológicos y rutas de señalización. La disfunción de varios microARN se ha demostrado en muchos caos, incluyendo el cáncer, trastornos neurodegenerativos y enfermedades cardiovasculares. Durante los años recientes, el posible poder terapéutico de los microARN aparecido por las aplicaciones satisfactorias de las inyecciones intravenosas del precursor de microARN o inhibidores de microARN (antagomir), que dan lugar a la regulación de genes o rutas que eran disfuncionales en condiciones de enfermedad específicas. Actualmente, están bajo investigación muchas estrategias terapéuticas basadas en la modulación de la expresión de microARN individuales.

Los miARN ejercen su función basándose en la complementación de bases principalmente en las regiones no traducidas 3' (UTR) de sus ARNm dianas, dando lugar al reconocimiento de estos ARNm dirigidos por el complejo silenciador inducido por ARN (RISC) asociado con los miARN (Valencia-Sanchez et al., 2006; Bartel, 2009). La formación de un dúplex por complementariedad de bases entre el miARN y principalmente la región 3' de los ARNm diana, da lugar a la degradación de los ARNm o la regulación negativa de la traducción mediante la asociación con el complejo silenciador inducido por ARN (RISC) (Valencia-Sanchez et al., 2006; Bartel, 2009). Sin embargo, hasta la fecha los papeles funcionales de solo unos cuantos miARN individuales se han presentado para el desarrollo cardíaco o la homeostasis cardiaca (van Rooij et al., 2007; Zhao et al., 2007; Ventura et al., 2008; Liu et al., 2008; Callis et al., 2009; van Rooij et al., 2009). Por lo tanto, la generación de mutantes de pérdida de y ganancia de función para otros miARN individuales es necesaria para ganar conocimientos adicionales de la mecánica de la regulación dependiente de miARN de las funciones y homeostasis cardíacas.

El documento WO 2008/016924 desvela la identificación de un microARN, miR-208, que induce la expresión de la cadena pesada de la β-miosina (β-MHC) y reprime los genes de proteína contráctil del músculo esquelético rápido. La inhibición de esa función se ha propuesto como un tratamiento para la fibrosis cardíaca, hipertrofia y/o insuficiencia cardíaca, y el aumento de esta función se puede utilizar para reprimir los genes de fibra lenta y activar los genes de fibras rápidas en el tratamiento de trastornos musculoesqueléticos.

El documento WO 2009/106367 desvela una región promotora de microARN, el uso de un microARN, en particular miR-21, y los elementos relacionados para el diagnóstico y para la fabricación de un medicamente para el tratamiento y/o la prevención de fibrosis y/o enfermedades relacionados con la fibrosis.

Katare et al., 2011, Circ. Res. 109: 894-906 investigaron la actividad terapéutica y dianas mecánicas de células progenitoras de pericitos derivados de la vena safena (SVP) en un modelo de infarto de miocardio (IM) de ratón, El trasplante del SVP induce una mejora a largo plazo de la función cardíaca mediante un nuevo mecanismo paracrino que implica la secreción de miR-132 y la inhibición de sus genes diana.

Después del nacimiento, muchos sistemas orgánicos se someten a modificaciones funcionales sustanciales, que se consiguen por un cambio post-natal de los programas genéticos 'fetal' a 'adulto' (1). Durante la insuficiencia cardíaca, el programa genético 'fetal' se reactiva en el corazón adulto debido al estrés hemodinámico o metabólico. La re-expresión de los genes que están normalmente reprimidos en los cardiomiocitos adultos es una adaptación a las demandas alteradas de energía y el agrandamiento hipertrófico de los cardiomiocitos (Barry y Townsend, 2010; Taegtmeyer et al., 2010).

El miR-212 se ha descrito como pro-hipertrófico y altamente regulado positivamente en el miocardio humano insuficiente (Thum et al., 2007; Bauersachs y Thum, 2007; Thum et al., 2008).

La familia genética del miR-212/132 está altamente conservada en vertebrados, incluyendo peces y mamíferos. Los inventores habían demostrado anteriormente que la eliminación genética del miR-212/312 en ratones da lugar a la alteración del desarrollo de la glándula mamaria en la pubertad (Ucar et al., 2010; Ucar et al., 2011). Recientemente se ha demostrado también que la eliminación genética dirigida del miR-212/132 en el hipocampo de ratones da lugar a una maduración dendrítica alterada de las neuronas del hipocampo (Magill et al., 2010). Además, la sobre-expresión transgénica de miR-132 en cerebro de ratones, tiene influencia sobre las funciones del comportamiento incluyendo la regulación del reloj circadiano y reconocimiento de nuevos objetos (Hansen et al., 2010; Alvarez-Saavedra et al., 2011).

Se desarrolló un formato de ensayo que permite el análisis simultáneo de moléculas de miARN con respecto al efecto fenotípico en cardiomiocitos primarios de rata. En este ensayo, se confirmó el potencial pro-hipertrófico de miR-212. Sin embargo, no se encontró una correlación entre la expresión del miARN endógeno y el potencial pro-hipertrófico, desfavoreciendo la presunción de que la fuerte expresión endógena se correlacionaba con la actividad

(Jentzsch et al., 2011).

Por lo tanto, los papeles funcionales *in vivo* de miR-212/132 no se ha explorado aún en organismos vivos, particularmente en situaciones patológicas. Aquí, los inventores demuestran que las afecciones hipertróficas inducen la expresión de la familia miR-212/132 y tanto el miR-212 como el miR-132 regulan la hipertrofia cardíaca y la autofagia en cardiomiocitos. Más particularmente, se demostró que el estímulo hipertrófico da lugar a la regulación positiva de la expresión de miR-212 y miR-132 en cardiomiocitos. La regulación positiva de ambos miR es necesaria y suficiente para dirigir el crecimiento hipertrófico de los cardiomiocitos. Los ratones nulos en miR-212/132 están protegidos de la insuficiencia cardíaca inducida por sobre-presión, mientras que la sobre-expresión específica en cardiomiocitos de la familia miR-212/132 da lugar a hipertrofia cardíaca patológica, fallo cardíaco y mortalidad en ratones. Tanto el miR-212 como miR-132 se dirigen directamente al factor FoxO3 anti-hipertrófico y pro-autofágico. Por lo tanto, la sobre-expresión de miR-212/132 en cardiomiocitos da lugar a la regulación negativa de la expresión de FoxO3 y en consecuencia a una hiperactivación de la señalización de calcineurina pro-hipertrófica y la actividad transcripcional de NFAT, así como a una disminución de la autofagia. El bloqueo farmacológico por inyección de un antagomir contra miR-132 rescataba la insuficiencia cardíaca inducida por sobre-presión en ratones, ofreciendo una estrategia terapéutica para la hipertrofia cardíaca patológica.

Por lo tanto, una materia objeto de la presente divulgación es un inhibidor de miR-132 para su uso en medicina, por ejemplo, en medicina veterinaria o en medicina humana.

Una materia objeto adicional de la presente divulgación es un método para la prevención o el tratamiento de hipertrofia cardíaca, trastornos asociados a hipertrofia cardíaca o autofágicos, y/o disfunción cardíaca, que comprende la administración a un sujeto que necesita el mismo de una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un inhibidor de miR-132. En una realización preferida, la invención se refiere a un inhibidor de miR-132 humano (miR-132 de *Homo sapiens* UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG (SEQ ID NO: 1)). También se describe un miR-213 de *Homo sapiens* UAACAGUCUCCAGU-CACGGCC) (SEQ ID NO: 2). Otra realización preferida se refiere a un inhibidor del miR-132 de ratón (miR-132 de *Mus musculus* UAACAGUCUACAGCCAUGGUCG (SEQ ID NO: 3). También se describe es el miR-212 de *Mus musculus* UAACAGUCUCCAGUCACGGCCA (SEQ ID NO: 4). Las secuencias de miR-132 humano y de ratón son idénticas. El inhibidor es preferentemente una molécula de ácido nucleico, incluyendo molécula de ARN, moléculas de ADN y moléculas de ácido nucleico modificado que comprenden al menos un ácido nucleico con un componente básico modificado. Preferentemente, el inhibidor es una molécula de ARN que tiene al menos un componente básico modificado. El ácido nucleico inhibidor de la presente invención preferentemente tiene una complementariedad suficiente con el miR-132, particularmente con el miR-132 humano para formar un hibrido en condiciones fisiológicas, reduciendo y/o aboliendo de esta manera el efecto pro-hipertrófico y/o anti-autofágico de miR-132.

El inhibidor puede ser una molécula de cadena sencilla o doble cadena o una molécula de ácido nucleico que comprende partes de cadena sencilla y doble cadena. La molécula de ácido nucleico se puede conjugar con moléculas heterólogas, por ejemplo, moléculas no ácidos nucleicos tales como ácidos grasos, lípidos, sacáridos, péptidos, proteínas, anticuerpos, nanopartículas, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), análogos de nucleótidos (LNA).

En una realización preferida, el inhibidor de ácido nucleico puede comprender al menos un componente básico modificado. Los componentes básicos modificados se pueden seleccionar de componentes básicos modificados en la estructura, en un azúcar y una base nucleica y combinaciones de los mismos, es decir, los componentes básicos tienen varias modificaciones, por ejemplo, una modificación de un azúcar o la estructura.

Los componentes básicos modificados en una base nucleica comprenden una base nucleica no convencional o una base nucleica convencional (por ejemplo, adenina, guanina, citosina, timina o uracilo) tal como un uracilo o citosinas modificados en la posición 5, por ejemplo, 5-metilcitosina, 5-(2-amino) propiluracilo, 5-bromouracilo, adeninas o guaninas modificadas en el posición 8, por ejemplo, 8-bromoguanina, bases nucleicas deazapurínicas, por ejemplo, 7-deaza-adenina y bases nucleicas O- o N-alquiladas, por ejemplo, N6 alquil-adenina.

Además, la invención engloba componentes básicos modificados en un azúcar, particularmente los componentes básicos de ribonucleótidos modificados en un azúcar, en los que el grupo 2'OH se sustituye por un grupo que se selecciona de entre H, OR, R, halo, SH, SR, NH, NHR, NR2 o CN, en el que R es un $C_1$-$C_6$ alquilo, $C_2$-$C_6$ alquenilo o $C_2$-$C_6$ alquinilo y halo es F, Cl, Br o I. Los nucleótidos adicionales modificados en un azúcar se seleccionan de entre LNA o nucleótidos morfolino.

En los componentes básicos modificados en la estructura preferidos, el grupo fosfoéster que conecta los componentes básicos adyacentes se sustituyen por un grupo modificado, por ejemplo, remplazando uno o más átomos de O del grupo fosfoéster por S, Se, NR o CR2, en el que R es como se ha definido anteriormente. Se debería señalar que las modificaciones anteriores se pueden combinar.

En una realización, el inhibidor puede ser una molécula de ARN de doble cadena capaz de hacer de ARN de interferencia que se dirige contra una transcripción que comprende el miR-132 o precursores del mismo, por ejemplo una molécula de ARNip que es una molécula de ARN de doble cadena, en el que cada cadena tiene una longitud de

15-30, preferentemente de 19-25 nucleótidos, que opcionalmente tienen al menos una protuberancia 3' que tiene una longitud de 1-5 o 1-3 nucleótidos. Las moléculas de ARNip típicas se describen, por ejemplo, en el documento WO 02/044321.

En otra realización preferida, el inhibidor de ácido nucleico es un antagomir, que es una molécula de ARN de cadena sencilla que tiene una longitud de 10 a 30 nucleótidos, preferentemente de 12 a 25 nucleótidos e incluso más preferentemente de 15 a 22 nucleótidos. El antagomir puede ser perfectamente complementario a su miARN específico diana con una deficiencia en el lado de escisión de Ago2 y/o la presencia de al menos un componente básico modificado para inhibir la escisión en Ago2. Los antagomires se desvelan, por ejemplo, en Krützfeldt et al., 2005, Czech, 2006 o Fiedler et al., 2011, cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia.

Los antagomires preferidos están conjugados con colesterol, conjugados con LNA o conjugados con FMOE. En una realización particular preferida los antagomires se dirigen contra el miR-132 como se ha descrito anteriormente.

Preferentemente, una molécula inhibidora de ácido nucleico tiene una complementariedad de secuencia suficiente con el miR-132 y/o un precursor del mismo con el fin de mediar la inhibición específica de la diana, por ejemplo, formando un hibrido de doble cadena con la diana. Preferentemente, la secuencia tiene una complementariedad de al menos un 50 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 % o hasta el 100 % en la parte que corresponde a la diana.

Los inhibidores de ácido nucleico de la invención se pueden preparar por métodos convencionales, por ejemplo, por métodos de síntesis química habitualmente que implican la síntesis en fase sólida de acuerdo con protocolos convencionales. Los inhibidores se pueden también preparar por transcripción enzimática de matrices de ADN sintéticas o de ADN plasmídicos, por ejemplo, aislados de bacterias recombinantes.
Normalmente, se utilizan polimerasas de fagos ARN, tales como T7, T3 o ARN polimerasa SP6.

El inhibidor de la presente invención es útil en la prevención o tratamiento de trastornos cardíacos, particularmente de trastornos asociados a hipertrofia cardíaca o autofágicos.

Más particularmente, el inhibidor es útiles en la prevención o tratamiento de la disfunción contráctil, descompensación cardíaca, insuficiencia cardíaca o para evitar el re-modelamiento cardíaco después de infarto de miocardio, miocarditis, enfermedades valvulares cardíacas tales como estenosis aórtica o insuficiencia de la válvula mitral, trastornos cardíacos genéticos con hipertrofia cardíaca, por ejemplo, cardiomiopatía hipertrófica no obstructiva y obstructiva, enfermedad de Fabry.

Con respecto a los trastornos autofágicos, este término engloba trastornos en los que los pacientes presentan autofagia disfuncional, en particular autofagia reducida o ausente. Las enfermedades y afecciones que se pueden tratar administrando el inhibidor de acuerdo con la invención incluye enfermedades neurodegenerativas tal como la Enfermedad de Huntington, Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Alzheimer, y ataxia medulocerebelar; enfermedades hepáticas; enfermedades musculares tales como la enfermedad de Danon, enfermedad de Pompe, Miositis de cuerpos de inclusión esporádica, distrofia muscular de la cintura apendicular, en particular de tipo 2B, y miopatía de Miyoshi; cáncer, incluyendo cáncer de mama, colon, ovárico y próstata, linfoma folicular, cánceres epiteliales como consecuencia del síndrome de Peutz-Jeghers; trastornos autoinmunitarios, por ejemplo, enfermedad de Crohn; enfermedades infecciosas. El trastorno autofágico cardíaco se selecciona de entre los trastornos cardíacos incluyendo la degeneración muscular cardíaca y esquelética. Los trastornos adicionales incluyen el envejecimiento, enfermedad de Paget, enfermedad de la neurona motora con atrofia muscular medular y bulbar, enfermedad de Batten, y complejo de esclerosis tuberosa.

En aspectos preferidos, la administración del inhibidor activa farmacológicamente la autofagia en el paciente. El inhibidor se administra a un sujeto en necesidad del mismo, particularmente a un paciente humano que padece las enfermedades indicadas anteriormente.
En algunas realizaciones, el inhibidor es útil para la administración a pacientes que se seleccionan de entre los pacientes que tiene un aumento del riesgo de insuficiencia cardíaca, pacientes que padecen insuficiencia cardíaca (congestiva), pacientes después de un infarto de miocardio o pacientes con enfermedades cardíacas congénitas asociadas con hipertrofia cardíaca, tales como estenosis de la vena pulmonar, defectos del septo ventricular o auricular. Preferentemente, la invención engloba el diagnóstico y/o control de la cantidad y/o actividad del miR-132 antes, durante y/o después de la administración del inhibidor.
El inhibidor se puede administrar como una composición farmacéutica que comprende un vehículo y diluyente farmacológicamente aceptable. La administración se puede llevar a cabo por métodos conocidos, en los que el inhibidor se introduce en las células diana deseada *in vitro* o *in vivo*. Los métodos adecuados de administración incluyen inyección, transferencia vírica, uso de liposomas, por ejemplo, liposomas catiónicos, ingestión oral y/o aplicación dérmica.
Para las aplicaciones farmacéuticas, la composición puede estar en forma de solución, por ejemplo, una solución, emulsión, suspensión inyectables o similares. La composición se puede administrar por cualquier vía adecuada, por ejemplo, por inyección, infusión, ingestión oral y/o aplicación dérmica. El vehículo puedes ser cualquier vehículo farmacéutico adecuado. Preferentemente, se utiliza un vehículo que es capaz de aumentar la eficacia de las

moléculas de ARN para penetrar en las células diana. Ejemplos adecuados de dichos vehículos son los liposomas.

El inhibidor se administra en una dosificación farmacéuticamente eficaz, que puede estar en el intervalo de 0,001 µg/kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso corporal dependiendo de la vía de administración y el tipo o gravedad de la enfermedad.

El inhibidor de la presente invención puede comprender un único tipo de molécula inhibidora o una pluralidad e diferentes moléculas inhibidoras, por ejemplo, una pluralidad de diferentes antagomires. Por ejemplo, un inhibidor del miR-212, por ejemplo, un antagomir, se puede combinar con un inhibidor de miR-132., por ejemplo, un antagomir.

El inhibidor se puede administrar como una monoterapia o en combinación con un medicamento diferente adicional, particularmente un medicamento adecuado para la prevención o tratamiento de trastornos cardíacos como se ha descrito anteriormente. Ejemplos de medicamentos adicionales son agentes moduladores de angiotensina, β-bloqueantes, diuréticos, antagonistas de aldosterona, vasodilatadores, agentes inotrópicos, estatinas o combinaciones de los mismos.

El un aspecto adicional más, la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico, particularmente una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla o cadena doble, que comprende

(a) una secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 1 o un precursor de la SEQ ID NO: 1, y/o
(b) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos un 80 %, al menos un 90 %, o particularmente al menos un 95 % con respecto a una secuencia de (a).

para su uso en el tratamiento o prevención de trastornos cardíacos que implican trastornos autofágicos cardíacos y/o atrofia cardíaca.

En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico aislada tiene una secuencia de identidad de al menos un 90 %, particularmente al menos un 95 %, respecto a una secuencia de nucleótidos que se muestran en la SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 3 o respecto a un precursor de la SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 3, o respecto a una secuencia de nucleótidos que es la complementaria de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 y/o 3 o un precursor de las mismas. En particular, un precursor de la SEQ ID NO: 1 o 3 puede tener la secuencia que se muestra en una de las SEQ ID NO: 6 y/o 7.

El porcentaje de identidad de secuencia se puede determinar de acuerdo con la siguiente fórmula de la siguiente manera:

$$I = n:L$$

donde I es el porcentaje de identidad, n es el número de nucleótidos idénticos entre una secuencia determinada y una secuencia de comparación como se muestra en las SEQ ID NO: 1-4 o sus precursores, o una complementaria de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, y/o 4 o un precursor de las mismas, y L es la longitud de la secuencia de comparación. De manera importante, cuando se calcula el porcentaje de identidad de secuencia de acuerdo con esta fórmula, se llevará a cabo un alineamiento de las dos secuencias sin huecos entre las porciones complementarias. El ácido nucleico de la presente invención preferentemente tiene una identidad de secuencia suficiente y/o complementariedad de secuencia con el miR-212 y/o miR-132, particularmente con el miR-212 humano y/o miR-132 humano para ser capaz de compensar o inhibir la función de miR-212 y/o miR-132 en condiciones fisiológicas, proporcionando de esta manera, la recuperación, mejora y/o inhibición del efecto pro-hipertrófico y/o anti-autofágico de miR-212 y/o miR-132.

Las condiciones rigurosas de hibridación comprenden el lavado durante 1 h en 1 x SSC a 45 ºC, preferentemente a 48 ºC y más preferentemente a 50 ºC, particularmente durante 1 h en 0,2 x SSC y 0,1 % de SDS.

La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la invención puede ser una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla o cadena doble o una molécula de ácido nucleico que comprende partes de cadena sencilla y cadena doble. La molécula de ácido nucleico se puede conjugar con moléculas heterólogas, por ejemplo, moléculas no ácido nucleico tales como ácidos grasos, lípidos, sacáridos, péptidos, proteínas, anticuerpos, nanopartículas, ácidos nucleicos peptídicos (PNA), análogos de nucleótidos fijados (LNA).

En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico es una molécula de microARN (miARN, miR) o un precursor o un análogo de los mismos. Las moléculas de miARN como tales son moléculas habitualmente de cadena simple, mientras que el precursor de miARN habitualmente una molécula al menos parcialmente auto-complementaria capaz de formar distintas partes de cadena simple y de doble cadena, por ejemplo, estructuras en tallo y en bucle. Las moléculas de ADN que codifican los miARN y las moléculas precursoras de miARN también están presentes habitualmente como moléculas de doble cadena, por ejemplo, en forma de un producto PCR o en un plásmido.

La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la invención tiene preferentemente una longitud de desde 15 a 150 nucleótidos (nt). Las transcripciones primarias, de las que se generan los precursores de miARN, pueden tener también una longitud de > 150 nt y hasta 5000 nt. En particular, las moléculas de miARN maduras tienen una longitud de desde 18-25 nucleótidos, preferentemente 19-24 nt, más preferentemente 21, 22 o 23 nt, y las moléculas precursoras de miARN tienen una longitud de 50-120 nucleótidos, preferentemente 60-110 nt.

Más preferentemente, una molécula de miARN para su uso de acuerdo con la invención tiene una longitud de 21 o 22 nucleótidos.

En una realización preferida adicional, la molécula de ácido nucleico aislada para su uso de acuerdo con la invención es una molécula de ADN, que comprende al menos un componente básico modificado. Los componentes básicos de nucleótido modificado se pueden seleccionar de componentes básicos modificados en una base nucleica, un azúcar, y la estructura y combinaciones de los mismos, es decir, componentes básicos que tienen varias modificaciones, por ejemplo, una modificación en un azúcar y la estructura.

los componentes básicos modificados en una base nucleica comprende una base nucleica no convencional o una base nucleica convencional (por ejemplo, adenina, guanina, citosina, timina o uracilo) tal como un uracilo o citosinas modificadas en la posición 5, por ejemplo 5-metilcitosina, 5-(2-amino) propiluracilo, 5-bromouracilo, adeninas o guaninas modificadas en la posición 8, por ejemplo, 8-bromoguanina, bases nucleicas deazapurínicas, por ejemplo, 7-deaza-adenina y bases nucleicas O- o N-alquiladas, por ejemplo, N6 alquil-adenina.

Además, la invención engloba componentes básicos modificados en un azúcar, particularmente componentes básicos ribonucleotídicos modificados en un azúcar, en el que el grupo 2'OH está sustituido por un grupo seleccionado de entre H, OR, R, halo, SH, SR, NH, NHR, $NR_2$ o CON, en el que R es $C_1$-$C_6$ alquilo, $C_2$-$C_6$ alquenilo o $C_2$-$C_6$ alquinilo y el halo es F, Cl, Br o I. Los nucleótidos adicionales preferidos modificados en un azúcar se seleccionan de entre LNA o nucleótidos morfolino.

En los componentes básicos modificados en la estructura, el grupo fosfoéster que conecta los componentes básicos adyacentes se sustituye por un grupo modificado, por ejemplo remplazando uno o más átomos de O del grupo fosfoéster por S, Se, NR, o $CR_2$, en el que R es como se ha definido anteriormente. Se debería señalar que las modificaciones anteriores se pueden combinar.

Las moléculas de ácido nucleico para su uso de acuerdo con la invención se pueden sintetizar químicamente. Los métodos para la síntesis química de ácidos nucleicos son conocidos por el experto en la técnica de la bioquímica de ácidos nucleicos.

DE manera alternativa, las moléculas de ácido nucleico se pueden obtener, por ejemplo, por métodos recombinantes, tales como la transcripción enzimática de estructuras sintéticas de ADN (por ejemplo, productos PCR) o de plásmidos aislados de organismos recombinantes, por ejemplo, bacterias o cepas de levaduras. Para la transcripción, se utilizan normalmente ARN polimerasas, por ejemplo, T7, T3 o SP6 ARN polimerasas.

Las moléculas de ácido nucleico también pueden obtenerse mediante un vector de expresión recombinante que comprende un ácido nucleico recombinante unido operativamente a una secuencia de control de la expresión, en la que la expresión, es decir, la transcripción y opcionalmente procesar adicionalmente los resultados en una molécula de miARN molécula precursora de miARN como se ha descrito anteriormente. El vector es preferentemente un vector ADN, por ejemplo, un vector vírico o un plásmido, particularmente un vector de expresión adecuado para la expresión de ácido nucleico en una eucariota, más particularmente en células de mamífero. El ácido nucleico recombinante contenido en dicho vector puede ser una secuencia de resulta de la transcripción de la molécula de miARN como tal, un precursor o una transcripción primaria de la misma, que puede ser procesado adicionalmente para dar lugar a la molécula de miARN.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas son útiles en el diagnóstico, tratamiento o prevención de trastornos, en particular trastornos cardíacos, que implican autofagia disfuncional, atrofia cardíaca, y/o hipertrofia cardíaca.

Más particularmente, las moléculas de ácido nucleico aisladas son útiles en el diagnóstico, tratamiento o prevención de trastornos que implican atrofia cardíaca y/o autofagia exagerada. Ejemplos de dichos trastornos son cáncer, caquexia asociada con cáncer, anorexia, y/o bulimia.

En una realización preferida, la molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la invención es para su uso en el diagnóstico, tratamiento o prevención de caquexia cardíaca.

Las moléculas de ácido nucleico se administran a un sujeto que tiene necesidad del mismo, particularmente a un paciente humano que padece una o más de las enfermedades indicadas anteriormente.

En algunas realizaciones, las moléculas de ácido nucleico son para la administración a los pacientes seleccionados de entre: (i) pacientes que tienen un aumento del riesgo o que padecen trastornos autofágicos, (ii) pacientes que

tienen un aumento del riesgo o que padecen caquexia cardíaca, (iii) pacientes que tienen un aumento del riesgo o que padecen atrofia cardíaca.

Preferentemente, la invención engloba el diagnóstico y/o la monitorización de la cantidad y/o actividad del miR-132 antes, durante y/o tras la administración de las moléculas de ácido nucleico.

El inhibidor se puede administrar solo o como una composición farmacéutica que comprende un vehículo y/o diluyente farmacológicamente aceptable y opcionalmente excipientes adicionales. La administración se puede llevar a cabo por métodos conocidos, en los que la molécula de ácido nucleico, por ejemplo, un miARN, se introduce en la célula diana deseada *in vitro* o *in vivo*. Los métodos de administración adecuados incluyen la inyección, transferencia vírica, uso de liposomas, por ejemplo, liposomas catiónicos, ingestión oral y/o aplicación dérmica.

Para las aplicaciones farmacéuticas, la composición puede estar en forma de una solución, por ejemplo una solución, emulsión, suspensión inyectables o similares. La composición se puede administrar de cualquier manera adecuad, por ejemplo, por inyección, infusión, ingestión oral y/o aplicación dérmica. El vehículo puede ser cualquier vehículo farmacéutico adecuado. Preferentemente, un vehículo que se utiliza en capaz de aumentar la eficacia de las moléculas de ARN para penetrar en las células diana. Los ejemplos adecuados de dichos vehículos son los liposomas.

El inhibidor se administra en una dosificación farmacéuticamente eficaz, que puede estar en el intervalo de 0,001 mg/kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso corporal dependiendo de la vía de administración y el tipo o gravedad de la enfermedad.

En realizaciones adicionales preferidas, la molécula de ácido nucleico se administra en combinación con un medicamento adicional; en particular, el medicamente adicional puede ser útiles en el tratamiento de la misma enfermedad. Ejemplos de medicamentos adicionales son agentes moduladores de angiotensina, β-bloqueantes, diuréticos, antagonistas de aldosterona, vasodilatadores, agentes inotrópicos, estatinas o combinaciones de los mismos.

Más adicionalmente, la invención se refiere a un método para la prevención o tratamiento de un trastorno cardíaco que comprende la administración a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una molécula de ácido nucleico aislada como se describe en el presente documento.

Además, la presente invención describirá con más detalle mediante las siguientes Figuras y Ejemplos.

**Leyenda de las Figuras**

**Figura 1. Los microARN miR-212 y miR-132 se introducen durante las afecciones hipertróficas y promueven la hipertrofia de cardiomiocitos**

(a) La sobre-expresión de precursores de miARN de una biblioteca identificaba miARN que aumentaban el crecimiento de cardiomiocitos y la secreción de péptidos natriurético cerebral (BNP). La familia de miARN miR-212/132 está resaltada en círculos grises.
(b, c) Los efectos de los precursores e inhibidores (anti) de miR-212 y miR-132 sobre el tamaño del tamaño celular en comparación con los efectos de los controles desordenados (Scr). (n = 5-13).
Las imágenes representativas utilizadas para la cuantificación del tamaño celular de los cardiomiocitos se muestran en c.
(d) Los efectos de distintos estímulos pro-hipertróficos sobre la expresión de miR-212 y miR-132 en cardiomiocitos neonatales (n = 6-10).
(e) Los niveles de expresión miR-212 y miR-132 durante la hipertrofia ventricular izquierda inducida por presión 3 y 21 días después de la cirugía de constricción transaórtica (TAC) en ratones. (n = 4).
(f) los diámetros de cardiomiocitos después de la operación en falso o 3, 14 y 35 días después de la constricción transaórtica (TAC) (n = 4 por grupo).
(g, h) La expresión de miR-212 y miR-132 (normalizadas a niveles de sno-202) en cardiomiocitos fraccionados y fibroblastos cardíacos derivados de ratones adultos después de 3 y 35 días de la constricción transaórtica (TAC).
Todos los valores representan la media ± SEM.
*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005 FC: vece de cambio, ACTN2: alfa actinina cardíaca, n.s.: diferencia no significativa, a.u: unidad arbitraria. La barra de escala en c representa 50 µm.

**Figura 2. Los microARN miR- 212 y miR-132 inducen hipertrofia en líneas celulares de cardiomiocitos**
Efectos de la sobre-expresión de precursores de miR-212 y/o miR-132 (pre-) (a, d) y silenciamiento por inhibidores (anti) (b, e) sobre el tamaño de células H9c2 (a, b) y HL-1 (d, e) en comparación con los efectos de controles desordenados (scr), (c) tamaño celular de células H9c2 de tipo silvestre (TS) y transgénicas (TG) que sobre-expresan miR212/132. Los valores representan la media ± SEM. (n = 5-14) **p<0.01; ***p<0.005; a.u. = unidad arbitraria.

**Figura 3. La familia de miARN miR212/132 reduce la apoptosis en células H9c2.**

(a) Niveles de expresión de miR-132 y miR-212 en líneas celulares de H9c2 que sobre-expresan miR-212/132 (miR-212/132 TG) y de control. (n = 3).
(b) Aumento del número de células dependiente del tiempo en líneas celulares de H9c2 que sobre-expresan miR-212/132 (TG-I, TG-II) y de control (I, II). (n = 6).
(c, d) Número de células apoptóticas evaluadas por análisis Annexin-V FACS (c) y tasa de proliferación medida por el ensayo WST (d) en presencia de FCS alto (10 %) y bajo (1 %) en líneas celulares H9c2 que sobre expresan miR-212/132 y de control. (n = 6). Todos los valores representan la media + SEM en a, c y d; y la media + SD en b. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005; n.s., diferencia no significativa.

**Figura 4. La sobre-expresión de la familia miR-212/132 específica en cardiomiocitos da lugar a hipertrofia cardíaca patológica e insuficiencia cardíaca en ratones**

(a) Sobre-expresión de la construcción de miR-212/132 bajo el control del promotor MHC alfa.
(b) Niveles de expresión de miR-212 y miR-132 en las muestras cardíacas de ratones de tipo silvestre (TS) y transgénicos a miR-212/132 (TG) según se ensaya por análisis RT-PCR convencional.
Se utilizó el Rnu6b como control constitutivo.
(c) Se analizó la tasa de supervivencia de dos familias de ratón miR-212/132 transgénicos (TG-Fam23, TG-Fam43) frente a los controles por el ensayo de supervivencia de Kaplan-Meier. (n = 87, 65, y 53 para TA, TG-Fam23, y TG-Fam43, respectivamente).
(d) Morfología de corazones explantados de ratones TG y TS a las 10 semanas tras el nacimiento.
(e – f) Las relaciones entre peso cardíaco respecto al cuerpo (e) y diámetro de cardiomiocitos (f) en ratones transgénicos alfa-MHC-miR-212/132 de 8 semanas de edad en comparación con la misma camada de tipo silvestre. (n = 5-7).
La barra de escala representa 50 µm.
(g – i) Análisis ecocardiográfico de las dimensiones cardíacas y función de ratones transgénicos alfa-MHC-miR-212/132 y controles de tipo silvestre (n = 16-18).
(g) área sistólica final, (h) área diastólica final, (i) acortamiento fraccional. Todos los valores e-i representan la media ± SEM. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005; WGA: aglutinina de germen de trigo (tinción de membrana).

**Figura 5. La sobre-expresión de la familia miR-212/132 da lugar a hipertrofia cardíaca.**

(a) relaciones de peso cardíaco respecto a corporal en líneas de ratón de tipo silvestre (TS) y transgénicas (TG-Fam23 y TG-Fam43) que sobre-expresan miR-212/132 específicos de cardiomiocitos entre los días 10 y 70 post-natal (p) así como durante la muerte/crisis. Los valores representan la media ± SEM. *p<0,05 frente a niveles p30; ***p<0,005 frente a niveles p30; (n = 3-13).
(b-f) Niveles de expresión de ARNm cardíaco de Anp (b), Bnp (c) cadena pesada de alfa-miosina (Myh6; d), cadena pesada de beta-miosina (Myh7; e) y niveles de proteína cardíaca de p-Akt (respecto a Akt; f) en ratones transgénicos (TG) que sobre-expresan miR-212/132 y las mismas camadas de tipo silvestre TS. Los valores representan la media ± SEM. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005; (n = 5-10).
(g) relaciones pAkt/Akt en líneas celulares H9c2 de tipo silvestre (TS) y que sobre-expresan miR-212/132 (n = 9). (h) Fenotipo de tipo silvestre (TS) no inyectado, y miR desordenados (scr), embriones de pez cebra inyectados con pre-miR-132 o pre-miR-212 48 h después de la fertilización.
Los embriones inyectados con pre-miR-132 y pre-miR-212 presentan un derrame pericárdico grave, en comparación con los inyectados desordenados o los embriones de control de tipo silvestre (flechas negras). M: marcador de transferencia de western; FC: veces de cambio.

**Figura 6. Los ratones nulos en miR-212/132 están protegidos de la hipertrofia cardíaca mediada por sobrecarga de presión, fibrosis e insuficiencia cardíaca**

(a) Relaciones de peso cardíaco respecto a corporal en ratones de 12 semanas de edad nulos a miR-212/132 (KO) y tipos silvestre (TS). (n = 5-6).
(b) Tamaño celular de cardiomiocitos de ratones recién nacidos nulos a miR-212/132 y tipo silvestre. (n = 5-6 aislamientos).
(c-f) relaciones de peso cardíaco respecto a corporal (c), diámetro de cardiomiocitos (d), fibrosis cardíaca (e), y peso húmedo de pulmón (f) en ratones de tipo silvestre operados en falso y ratones nulos a miR-212/132 y tipo silvestre 3 semanas después de la cirugía de constricción transaórtica (TAC). (n = 4-7). La barra de escala representa 50 µm.
(g-i) Análisis ecocardiográfico de las dimensiones y función cardíacas en ratones tipo silvestre operados en falso y ratones nulos a miR-212/132 y tipo silvestre 3 semanas después de la TAC (n = 4-11). (g) área diastólica final, (h) área sistólica final, (i) acortamiento fraccional). Todos los valores representan la media ± SEM. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005. #p<0,05 en comparación con TAC TS; ### p<0,005 en comparación con TAC TS; PSR: rojo picrosirio (tinción de colágeno).

**Figura 7. La represión de miR-212 y miR-132 no afecta la proliferación, apoptosis o comportamientos migratorios de los fibroblastos cardíacos humanos.**

Proliferación (a), apoptosis (b) y migración (c) de fibroblastos cardíacos humanos 72 h después de la transfección con control desordenado (Scr) y anti-miR-212 y anti-miR-132. (n = 6). Todos los valores representan la media ± SEM.

**Figura 8. Ausencia de fenotipo vascular evidente en ratones nulos en miR-212/132.**
Se estudió el sistema vascular en ratinas de ratones miR-212/132$^{-/-}$ adultos en comparación con la misma camada de tipo silvestre (TS). Área retiniana 8a), número y diámetro total de arterias retinianas centrales que se originan del nervio óptico (b, media una distancia de 200 µm del nervio óptico), y número de ramas de 1$^{er}$ orden que se originan de las arterias centrales (c, número por retina) eran similares en ratones miR-212/132$^{-/-}$ y en las mismas camadas de tipo silvestre. (n = 5-8 retinas de al menos 3 ratones).

(d) Tinción de secciones cardíacas de ratones de tipo silvestre (TS) y miR-212/132$^{-/-}$ (KO) por Pecam1, aglutinina de germen de trigo y DAPI. El gráfico representa el número de capilares por cardiomiocitos. (n = 5). Todos los valores representan la media ± SEM. Las barras de escala representan 2 µm en a, 500 µm en b y c. n.s: no significativo.

**Figura 9. La familia miR-212/132 regula directamente la expresión de FoxO3 y en consecuencia activa la señalización pro-hipertrófica calcineurina/NFAT.**

(a) Niveles de actividad de luciferasa en la co-transfección de una construcción de luciferasa que contiene el tipo silvestre o la 3'UTR mutada de FoxO3 con el control desordenado (scr), pre-miR-132, o pre-miR-212. (n =9).
(b, c) Niveles de expresión de FoxO3 en ARNm (b) y niveles proteicos (c) en corazones de ratones de tio silvestre (TS) y transgénicos (TG) alfa-MHC- miR-212/132. (n = 9-13).
(d) Niveles de ARNm de FoxO3 en cardiomiocitos de rata recién nacida transfectados con el control desordenado (scr), anti-miR-212 y anti-miR-132 después del tratamiento con fenilefrina (PE, 10 µM) (n = 6-9; valores de p contra scr + PE).
(e-g) Niveles de expresión de atrogin-1 (e) y Mcip1.4 (f) y niveles de actividad de calcineurina fosfatasa (g) en corazones de ratones de tipo silvestre y transgénicos alfa-MHC- miR-212/132. (n = 5-9).
(h) Actividad de luciferasa que muestra la actividad transcripcional NFAT de cardiomiocitos transfectados con el control desordenado (scr), pre-miR-132, o pre-miR-212. (n = 5).
(i, k) Niveles de ARNm Mcip1.4 (i) y atrogin-1 (k) en ratones de tipo silvestre (TS) y nulos en miR-212/132 (KO) 3 semanas después de la constricción transaórtica (TAC) o la operación en falso (n = 5-7 por grupo). Todos los valores representan la media ± SEM. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005. # p<0,05 en comparación con TAC TS.

**Figura 10. La sobre expresión de miR-212/132 da lugar a regulación negativa de FoxO3 y regulación positiva de Mcip1.4 en cardiomiocitos**

(a) Expresión de ARNm de FoxO3 en células H9c2 tipo silvestre (TS) y transgénicos (TG) que sobre-expresan miR-212/132.
(b) Niveles proteicos de FoxO3 en cardiomiocitos neonatales tres días después de la transfección con controles desordenados (scr), miR-132, miR-212, o moléculas precursoras de miR-132 y miR-212.
(c) Niveles de Mcip1.4 en células H9c2 tipo silvestre (TS) y transgénicas (TG) que sobre-expresan miR-212/132. FC: veces de cambio. Los valores representan la media ± SEM. *p<0,05; **p<0,01; #p<0,052 (n = 4-7).

**Figura 11. miR-212/132 es un factor anti-autofágico en cardiomiocitos**

(a) Niveles de expresión de ARNm de genes marcadores autofágicos en corazones de ratones de tipo silvestre (TS) y transgénicos (TG) alfa-MHC- miR-212/132. (n = 9-10).
(b, c) Relación de LC3II a LC3I (b) y niveles de proteína p62 (c) en ratones de tipo silvestre, nulos a miR-212/132 (KO) y transgénicos (TG) alfa-MHC- miR-212/132. (n = 4-12).
(d, e) Imágenes representativas (d) y cuantificación (e) de puntos LCR:mCherrry en células H9c2 de control y transgénicas que sobre-expresan miR-212/132 en condiciones normales y de privación de glucosa/suero. (n = 20).
(h, i) Gráficos FACS representativos (h) y cuantificación (i) del aumento del porcentaje de flujo autofágico en células H9c2 de control y transgénicas que sobre-expresan miR-212/132 en condiciones normales y de privación de glucosa/suero. (n = 3-4 experimentos). Todos los valores representan la media ± SEM. *p<0,05; ** p<0,005. Las barras de escala representan 50 µm en d y 500 nm en f.

**Figura 12. La sobre-expresión de miR-212/132 abroga la autofagia inducida por privación en cardiomiocitos primarios**

Se cuantificó el número medio de puntos LC3-GFP por cardiomiocitos en medio normal (DMEM + un 10 % FCS) o medio de privación (libre de glucosa y FCS) después de la co-transfección con la construcción de LC3-GFP junto con el control desordenado (Scr), pre-miR-212 o pre-miR-132. n = 40-170 cardiomiocitos. Todos los valores representan la media ± SEM. **p<0,01; ***p<0,005. Las imágenes representativas se muestran encima del gráfico. Las barras de escala representan 10 µm.

**Figura 13. Niveles de expresión de la proteína de fusión LC3-GFP.**

Expresión de proteína de fusión LC3-GFP en células H9c2 de tipo silvestre (TS) y transgénicas (TG) miR-212/132 transfectadas con una construcción de expresión LC3-GFP 24 h después de las condiciones de cultivo normal y de privación (medio libre de glucosa y suero). Los valores representan la media ± SEM. (n = 4).

**Figura 14. La privación da lugar a la regulación negativa de la expresión de miR-212/132 en células H9c2**

Expresión de miR-212 y miR-132 en células H9c2 24 h después de condiciones normales y privación de suero/glucosa. Los valores representan la media ± SEM. ***p<0,005 (n = 9).

**Figura 15. MiR-212/132 inhibe la autofagia inducida por privación *in vivo*.**

(a) Representación esquemática de un experimento de privación en ratones. Las partes blancas y grises de la línea de tiempo representan las fases de día y noche. Las flechas muestran el comienzo y duración de la privación y los puntos de tiempo indicados de privación cuando los animales se valoraron en cuanto al índice de condición corporal.

(b) Relaciones de LC3II respecto a LC3I en ratones tipos silvestre alimentados con dieta normal y ratones tipo silvestre, nulos a miR-212/132-/- y transgénicos alfa-MHC miR-212/132 bajo privación durante 21 horas (n = 4).

(c) Micrografías electrónicas de secciones ultra-finas de biopsias cardíacas embebidas en resina de ratones tipo silvestre (TS) nulos a miR-212/132 (KO) y que sobre-expresan miR-212/132 específicos de cardiomiocitos (TG). Los puntos blancos alrededor de las mitocondrias (estructuras gris oscuro) son vacuolas autofágicas. Los puntos electrodensos que se muestran con flechas blancas son autofagosomas. Las barras de escala representan 4 µm.

(d) relaciones p-mTOR/mTOR en células H9c2 de tipo silvestre y transgénicas miR-212/132 después de las condiciones normal y de privación (privados de suero y glucosa) (n = 6).

(e) relaciones p-mTOR/mTOR en ratones de tipo silvestre (TS) y transgénicos (TG) alfa MHC miR-212/132 alimentados con dienta normalo 31 h después de la privación (n = 4).

Todos los valores representan la medio ± SEM. **p<0,01; ***p<0,005. #p<0,11.

**Figura 16. Autofagia inducida por privación en corazones de ratones de tipo silvestre, nulos a miR-212/132 y que sobre-expresan miR-212/132**

Fotos de alta magnificación de micrografías electrónicas correspondientes a la Figura 15c para la confirmación de vacuolas autofágicas y autofagosomas en los cardiomiocitos. Las estructuras gris oscuro son mitocondrias (Mt). Las estructuras translúcidas (que se muestran con flechas) contienen estructuras de membrana enrolladas o membranas de doble capa indicativas de vacuolas autofágicas. Las estructuras negras electrodensas (que se muestran con puntas de flecha) en los cardiomiocitos de ratones TG son autofagosomas/autolisosomas. Las barras de escala representan 1 µm.

**Figura 17. La privación da lugar a un aumento de los niveles cardíacos de p62 *in vitro* e *in vivo*.**

(a) Expresión de la proteína p62 en células H9c2 de tipo silvestre (TS) y transgénicas (TG) miR-212/132 después de condiciones de cultivo celular normales y de privación (medio libre de glucosa y suero) (n = 9).

(b) Expresión cardíaca de proteína p62 en ratones de tipo silvestre (TS), nulos a miR-212/132 (KO) y transgénicos (TG) que sobre-expresan miR-212/132 después de una dieta normal o 31 horas después de la privación (n = 4).

Los valores representan la media ± SEM. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,05.

**Figura 18. Reducción de la unión de FoxO3 al promotor LC3 en células H9c2 que sobre-expresan miR-212/132**

(a) Niveles de promotor LC3 genómico después de inmunoprecipitación de cromatina por FoxO3 en células H9c2 de tipo silvestre (TS) y que sobre-expresan miR-212/132 (TG).

(b) Niveles de expresión de LC3 de células H9c2 de tipo silvestre y transgénicas (TG) miR-212/132 24 h después de condiciones de cultivo celular normales y de privación (medio libre de glucosa y suero).

Los valores representan la media ± SEM. **p<0,01; ***p<0,005; (n = 3-6).

**Figura 19. Niveles de expresión cardíaca de miR-132 después del tratamiento con el antagomir de ratones con sobre carga de presión ventricular izquierda.**

La expresión cardíaca de miR-132 en los ratones tres semanas después de la constricción transaórtica y la inyección terapéutica de un antagomir desordenado (Scr) o un antagomir dirigido contra miR-132 (Ant-132). Los valores representan la media ± SEM. ***p<0,005; (n = 5-14).

**Figura 20. La terapia con anti-miR-132 evita la insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión**

(a-c) Relaciones de peso cardíaco respecto a la corporal (a), diámetros de cardiomiocitos (b), y fibrosis cardíaca (c) en ratones operados en falso y ratones tratados con inyección intravenosa de control desordenado (Scr) o inhibidores de miR-132 (Ant-132) después de la TAC. Estos ratones se analizaron tres semanas después de la TAC. (n = 4-11).
(d-f) Análisis ecocardiográfico de las dimensiones cardíacas y función en ratones operados en falso y ratones tratados con inyección intravenosa del control (Scr) o inhibidores de miR-132 (Ant-132) después de la TAC. Estos ratones se analizaron tres semanas después de la TAC ((d) acortamiento fraccional, (e) área diastólica final, (f) área sistólica final). (n = 4-9). (g-i) niveles cardíacos de proteína FoxO3 (g) actividad de calcineurina (h) y niveles de ARNm de Mcip1.4 (i) en los ratones tratados con inyección intravenosa o el control (Scr) o inhibidores de miR-132 (Ant-132) tres semanas después de la TAC y el tratamiento (n = 4-8).
Todos los valores representan la media ± SEM. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005; #p<0,05 contra TAC-control; ##p<0,01 contra TAC-control; ###p<0,005 contra TAC-control. Las barras de escala representan 50 µm.

**Figura 21. La expresión de miR-1 está regulada por la familia miR-212/132.**

(a) Niveles de expresión de miR-1 en corazones de ratones (TS) y transgénicos (TG) que sobre-expresan miR-212/132 (n = 5 por grupo).
(b) Niveles de expresión de miR-1 en líneas celulares de H9c2 de tipo silvestres (TS) y transgénicas (TG) que sobre-expresan miR-212/132 (n = 8 por grupo).
Los valores representan la media ± SEM. *p<0,05; **p<0,01.

**Ejemplos**

**1. Métodos**

**1.1 Estudios de cultivos celulares**

Se prepararon cardiomiocitos primarios a partir de ratones o ratas recién nacidos utilizando protocolos estándar. La línea celular de cardiomiocitos H9c2 y los cardiomiocitos primarios se mantuvieron en DMEM + 10 % de FCS. La línea de cardiomiocitos HL1 se mantuvo en medio Claycomb + 10 % FCS. Para la transfección estable y transitoria de estas células, se utilizó el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Para la exploración de micro-ARN pro-hipertróficos, se utilizó la biblioteca del precursor de miARN (Pre-miR™ miRNA Precursor Library-Mouse V3; Ambion; de 50 nM cada una). Para la medición del tamaño celular, las células se fijaron con un 4 % de PFA y se calculó el área de superficie de los cardiomiocitos utilizando el paquete AxioVison Rel 4.4 (Carl Zeiss GmbH). El porcentaje de células que sufría apoptosis en los cardiomiocitos primarios o los cultivos de líneas celulares se determinó por tinción con anexina V y yoduro de propidio seguido por un análisis FACS (kit annexin-V-FLUOS, Roche). Para medir la capacidad proliferativa en células moduladas por miARN, se llevó a cabo un ensayo de proliferación WST-1 (Roche, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Para generar líneas celulares H9c2 transgénicas que sobre-expresan miR-212/132 transfectadas establemente, se preparó una construcción de expresión clonando el locus genómico completo de miR-212/132 (3,4 kb) corriente abajo del promotor CMV en el vector pTARGET (Promega). La construcción de expresión utilizada contenía un gen de neomicina bajo el control de un promotor PGK. La construcción preparada o el vector pTARGET original (como control) se utilizaron en los experimentos de transfección de la línea celular H9c2 utilizando el reactivo Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después de la transfección, las células se cultivaron en DMEM con un 10 % de FCS y 1 mg/ml de G418 (Roche) durante 8 días. Se prepararon 2 transfecciones independientes de ambas construcciones de sobre-expresión de miR-212/132 y de control. Después de la selección inicial mediada por G418, las células transfectadas establemente se cultivaron durante el mantenimiento y los experimentos con 0,5 mg/ml de G418.

**1.2 Estudios con animales**

Todos los estudios animales se llevaron a cabo de acuerdo con las directrices relevantes y regulaciones y con la aprobación de las autoridades locales y nacionales. La línea de ratón mutante con pérdida-de-función miR-212/132 se generó previamente (Ucar et al., 2010). La línea de ratón cruzó entre la C57Bl/6N de origen durante al menos 7 generaciones. Para la generación de las líneas de ratón transgénicas con la sobre-expresión de miR-212/132 específicos de cardiomiocitos, se clonó una región genómica de 486 pb en el locus genómico miR-212/132, que contenía las secuencias que codifican las secuencias del bucle tallo horquillado de miR-212 y miR-132, corriente abajo de la tercera secuencia exónica del gen α-MHC y corriente arriba de la secuencia de señal poliA hGH como se muestra en la Figura 4A. La construcción alineada se microinyectó en el pronúcleo de huevos fertilizados. Se obtuvieron dos líneas fundadoras independientes con sobre-expresión de miR-212/132 específica de corazón. A continuación, ambas líneas se cruzaron entre la C57BL/6N de origen durante al menos 6 generaciones.

**1.3 Modelo de constricción transaórtica (TAC) y aplicación del antagomir**

Se llevó a cabo la constricción transaórtica (TAC) en ratones C57Bl/6 machos (10-12 semanas de edad) de Charles

River Laboratories o ratones transgénicos alfa-MHC- miR-212/132 o los controles de su misma camada esencial mente como se había descrito (Rockman et al., 1991). Los antagomires se sintetizaron como se había descrito (Krutzfeldt et al., 2005) y se dirigieron contra miR-132 (5' CGACCAUGGCUGUAGACUGUUA-chol-3', donde "chol" es colesterol) o una secuencia desordenada (placebo de control). El tratamiento comenzó durante la operación de TAC y los animales recibieron inyecciones del control o el antagomir-132 por inyección retro-orbital (día 0 y día 1, un volumen de 0,1 ml que contenía antagomir-132 o control (cada 80 mg por kg de peso corporal)).

**1.4 Experimentos de privación *in vivo***

Los inventores llevaron a cabo la privación *in vivo* como se había descrito anteriormente (Kanamori et al., 2009) con algunas modificaciones. Para los animales que se iban a privar, los inventores los alojaron en jaulas únicas son acceso al alimento, pero con acceso ad libitum al agua 3 horas después del inicio de la fase de luz. Junto con el departamento de ética animal, los inventores establecieron un protocolo éticamente aceptable para la privación utilizando los criterios publicados de 'valoración de la condición corporal' (Ullman-Cullere & Foltz, 1999), que mostraba un periodo de 31 horas de privación como el máximo tolerable.

En consecuencia, los inventores controlaron todos los ratones privados durante el experimento y evaluaron su estado de salud basándose en el cambio de los siguientes parámetros: peso corporal, estado corporal, estado de hidratación, alerta y reacción a la provocación, y postura corporal, locomoción y estado del pelo. Después de 31 horas de privación, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se aislaron los corazones y se procesaron como se describe para los experimentos correspondientes.

**1.5 Análisis funcional cardíaco**

Se analizaron las dimensiones y la función cardíacas por electrocardiografía Doppler de onda pulsátil esencialmente como se había descrito (Merkle et al., 2007).

**1.6 Modelo de angiogénesis de retina**

La preparación de retina e inmunofluorescencia se llevaron a cabo como se había descrito previamente (Napp et al., 2012). . En resumen, se fijaron los ojos completos en paraformaldehído al 4 % (PFA). Se disecaron las retinas, después de fijarse con PFS y se bloquearon durante 24 horas con PBS/BSA 1 %/0,5 % Triton X-100. Después de la incubación con anticuerpos diluidos en PBS/0,5 %/0,25 % de Triton X-100 se aclararon las retinas con PBS y se montaron en un portaobjetos de cristal con cubreobjetos utilizando medio demo taje de alcohol polivinílico (DAKO). Se utilizaron los siguientes reactivos: Isolectina-B4-FITC (Vector, 1:100), anti-SMA-Cy3 (Sigma-Aldrich, 1:100). Las retinas teñidas se analizaron con un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axiovert) utilizando el software Axiovision (Zeiss, Goettingen).

**1.7 Ensayos de depósito de colágeno, recuento de capilares y diámetros de cardiomiocitos**

Para el análisis de depósito de colágeno, se tiñeron las secciones de parafina del miocardio ventricular izquierdo con rojo Sirius y ácido pícrico. El contenido en colágeno se calculó como el porcentaje del área de cada sección que estaba teñida con rojo Sirius.

Para el recuento de capilares se tiñeron las secciones con Pecam1 (CD31), Dapi y aglutinina de germen de trigo (WGA) y se hizo el recuento con el Software NIKON-NIS Element. Para cada animal se hizo el recuento de 4-7 regiones y se obtuvo un valor medio. El área de superficie del cardiomiocito se determinó de secciones del miocardio ventricular izquierdo teñido con hematoxilina y eosina o aglutinina de germen de trigo acoplados con Alexa 488. Las imágenes se analizaron utilizando los paquetes de software AxioVision (Zeiss).

**1.8 Fraccionamiento de células cardíacas**

Se perfundieron corazones intactos con solución enzimática basada en colagenasa (colagenasa tipo II) a través de la aorta. A continuación, se molió y se pasó cuidadosamente a través de una jeringa de 1 ml durante 3 minutos para producir suspensiones celulares. El fraccionamiento celular de cardiomiocitos y los fibroblastos se hicieron como se había descrito anteriormente (Thum et al., 2008).

**1.9 Reservas y embriones de pez cebra e inyecciones de miARN**

El tipo silvestre (cepa AB) se cultivaron y emparejaron a 28,5 ºC y los embriones se mantuvieron y manejaron en una solución E3 convencional (5 mM de NaCl, 0,17 mM de KCl, 0,33 mM de $CaCl_2$, 0,33 de $MgSO_4$, $10^{-5}$ % de azul de metileno) tamponado con 2 mM de HEPES (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como se había descrito previamente (Hentshel et al., 2007).

Utilizando el dispositivo de inyección Nanoject II (Drummond Scientific, Broomall, PA), se inyectaron los miR-132, miR-212 y controles desordenados en embriones fertilizados en estadio de una a cuatro células a una concentración

final de 5 mM en 4,6 nl de tampón de inyección (20 mM de Hepes, 200 mM de KCl y 0,01 % de rojo fenol). Se tomaron fotografías en un microscopio de disección SMZ-U (Nikon) y se procesó utilizando Photoshop 3.0 (Adobe).

**1.10 Predicción de miARN diana**

Las bases de datos miARN y las herramientas de predicción de diana Miranda (http://www.microrna.org/microrna/home.do), PicTar (http://pictar.mdc-berlin.de/) y TargetScan (http://www.target-scan.org) se exploraron para identificar las dianas miARN potenciales.

**1.11 Análisis RT-PCR cuantitativo**

Se aisló el ARN utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen) de tejidos o células cultivadas. Para la detección cuantitativa de microARN, se utilizaron ensayos TaqMan miARN (Applied Biosystems), kit de síntesis de ADNc iScript Select (BIO-RAD) y kits iQSupermix (BIORAD) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó Rnu6b como control para la normalización. Para la detección cuantitativa de niveles de ARNm, se sintetizaron los ADNc utilizando cebadores oligo-dT y kit de síntesis de ADNc iScript Select (BIO-RAD) Se llevaron a cabo análisis de PCR en tiempo real utilizando un conjunto específico de cebadores e iQSYBR Green mix (BIO-RAD). Se utilizaron los niveles de Gapdh para la normalización de niveles de expresión específica del gen. Los niveles de miARN-1 se determinaron por el kit Taqman-RT-PCR para miR-1 (Applied Biosystems). Otras secuencias de oligonucleótidos cebadores se representan en la Tabla 3.

**1.12 Análisis de expresión proteica**

Se lisaron el tejido o las células con 1x de tampón de lisis celular (Cell signaling) y se hizo el aislamiento de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se cargaron 20-40 µg de proteína en gel SDS-PAGE para la separación, lo que se continuó con una transferencia de la proteína a una membrana de fluoruro de polivinildeno en un Mini Trans-Blot electrophoretic transfer cell (Bio-Rad). A continuación, se detectaron diferentes antígenos utilizando los siguientes anticuerpos primarios: FoxO3 (Cell Signaling nº 2497), pAKT (Cell Signaling nº 9271), Akt (Cell Signaling nº 9272), LC3 (Abcam ab48394), p62 (Abeam ab56416), p-mTOR (Cell Signaling nº 5536), mTOR (Cell Signaling nº 2983), GFP (Abcam ab1218) y Gapdh (Abeam ab8245). Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con HRP y luminol/ácido paracumárico/$H_2O_2$ para la detección de bandas específicas. Intensidades de bandas obtenidas se cuantificaron utilizando el software ScionImage.

**1.13 Ensayos de calcineurina y NFAT**

Se llevó a cabo el ensayo de calcineurina utilizando el kit de Ensayo de Actividad Celular de Calcineurina (Enzo Life Sciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cuantificación del producto final se hizo midiendo la absorbancia a 620 nm en un lector de microplacas (Synergy HT). Para la determinación de la actividad de NFAT se sembraron cardiomiocitos de rata recién nacida en placas de 48 pocillos y se transfectaron después de 24 h con un control miR desordenado, miR-132 y miR-212 (concentración final 50 nM; Applied Biosystems, New Jersey, USA) utilizando Lipofectamina™ 2000 (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las células se cultivaron durante 24 h y se transfectaron con una construcción indicadora de luciferasa NFAT que contenía sitios de reconocimiento de NFAT (regalo de J. Molkentin, University of Cincinatti) como se ha descrito anteriormente (concentración final: 0,75 ng/ml) Se estimularon los grupos respectivos 48 h más tarde con fenilefrina (50 mM) durante 24 h. Se determinó la actividad de luciferasa utilizando el sistema de ensayo de luciferasa (Promega, Mannheim, Alemania) y se midió la concentración proteica utilizando el kit de ensayo proteico Pierce BCA (Thermo Scientific, Bonn, Alemania), ambos de acuerdo con el protocolo del fabricante.

**1.14 Ensayos de indicador de luciferasa**

La secuencia 3'UTR que alberga la región de base para miR-132/212 se clonó en el sitio de clonación SpeI e HindIII de un vector pMIR-REPORT (Ambion). También se generaron clones con sitios de unión de miR-212 y miR-132 mutados en la misma secuencia de 3'UTR utilizando un kit de mutagénesis dirigido al sitio (Agilent Technologies). Las construcciones clonadas se co-transfectaron con los miARN de interés (Ambion) y al plásmido β-galactosidasa de control (Promega) en células indicadoras HEK293 sembradas en placas de 48 pocillos utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). En cada caso, se utilizaron 10 ng de ADN plasmídico y 100 nM de miARN. Las células se incubaron durante 24 h antes de medirse la actividad de luciferasa y β-galactosidasa utilizando los kits del sistema de ensayo de luciferasa (Promega) y sistema de ensayo de beta-galactosidasa (Promega) en un lector multi-placa (Biotek, Synergy HT) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**1.15 Análisis estadístico**

Se utilizaron el software StatView y GraphPad para llevar a cabo el ensayo t de Student no alterado en caso de dos grupos de tratamientos (conjuntos de datos) o ANOVA de una vía siguiendo el análisis post-ensayo de Fisher para más de dos grupos (conjuntos de datos). Para el ensayo de supervivencia de Kaplan-Meier, se utilizó el ensayo de rango logarítmico (Mantel-Cox).

**1.16 Transfección y cuantificación de LC3:mCherry en autofagosomas**

La construcción de expresión para la proteína de fusión LC3:mCherry la suministró amablemente el Dr. Nathan Brady (Hamach-er-Brady et al., 2006). Las líneas celulares H9c2 se sembraron en cubreobjetos y después del 80 % de confluencia se transfectaron con la construcción de expresión LC3:mCherry utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La eficacia de transfección se mantuvo entre el 10-20 % con el fin de visualizar las células transfectadas a continuación. Para los grupos de privación, 12 horas después de la transfección, se sustituyó el medio (DMEM + 10 % de FCS) con solo DMEM. Después de 24 h de cultivo en DMEM, se sustituyó el medio con DMEM sin glucosa (GIBCO) y se mantuvieron otras 24 h antes de la fijación. Para los grupos de 'medio completo', los cambios de medio se hicieron exactamente las mismas veces que anteriormente pero siempre con DMEM + 10 % de FCS. Después del tratamiento, las células se fijaron con un 4 % de PFA, se hizo una contra-tinción con Hoechst y se montó. Las imágenes de células transfectadas se tomaron utilizando un microscopio de exploración láser confocal (FluoView 1000; Olympus) con un objetivo de aceite de 60x utilizando el modo de exploración secuencial. Las imágenes recolectadas se analizaron utilizando un software ImageJ con una macro especial diseñada para la cuantificación de puntos de LC3 en imágenes fluorescentes.

**1.17 Microscopía de transmisión de electrones**

Las líneas celulares H9c2 se sembraron en placas de 10 cm y se cultivaron primero en DMEM+10 % de FCS hasta una confluencia del 90 %. A continuación, para los grupos de 'privación', se cultivaron adicionalmente en DMEM solo durante 24 horas y después en DMEM sin glucosa durante 24 horas adicionales. Para los grupos de 'medio completo' los cambios de medio se hicieron exactamente al mismo tiempo pero siempre con DMEM+10 % FCS con glucosa. Al final de estos tratamientos, las células se fijaron con un 2 % de glutaraldehído (calidad-EM, Polysciences Alemania) tamponado en 150 mM de Na-cacodilato pH 7,2. El medio de cultivo se sustituyó directamente por el fijador, seguido por dos cambios con fijador recién preparado y se fijó durante la noche a 4 ºC. Después del lavado en tampón, las células fijadas se despegaron, se centrifugaron, los aglomerados se post-fiaron en un 1 % de tetraóxido de osmio (1h/4 ºC) y se embebieron en agarosa de baja fusión. La fijación con osmio se paró con un 67 % de etanol y seguido por una fijación en bloque con un 1 % de acetato de uranilo. Después de la deshidratación total mediante etapas graduales de etanol y óxido de propileno, se embebieron las muestras en resina epoxi. Se prepararon secciones ultra-finas con un grosor nominal de 60 nm, contratado con uranilo y plomo y se observó con un EM 912 (Carl Zeiss NTS, Alemania). Se registraron micrografías en placas de imagen y se exploraron con una resolución de 17,5 µm (Ditabis, Alemania). Las cuantificaciones de las vacuolas autofágicas se hicieron independientemente por dos individuos diferentes con los criterios de observación de la doble membrana y espacio vacuolar o estructuras de membrana enrolladas dentro de las vacuolas autofágicas.

Para los análisis ultra-estructurales de las muestras cardíacas de los ratones alimentados y privados, se prepararon pequeñas biopsias utilizando escalpelos nuevos. Se prepararon piezas de tejido menores de 1 $mm^3$ e inmediatamente se sumergieron en aldehído con tampón de fosfato que contenían un 2 % de formaldehído y un 2 % de glutaraldehído (ambos de calidad EM, Polysciences Alemania) y se almacenaron durante varios días a 4 ºC hasta que se procedió a embeberlas en resina, incluyendo la post-fijación con osmio y uranilo en bloque. Se prepararon secciones ultra-finas de los bloques de resina madurados con un espesor nominal de 60 nm (Ultracut UCT, Leica, Alemania) se contrastó mediante acetato de uranilo y citrato de plomo de Reynold y se observaron con un EM 912 (Carl Zeiss NTS, Alemania). Se registraron micrografías en las placas de imágenes que se iban a explorar con una resolución de 17,5 µm (Micron IP-scanner, Ditabis, Alemania).

**1.18 Método basado en FACS de cuantificación autofágica**

La construcción de expresión de la proteína de fusión LC3:GFP la proporcionó amablemente el Dr. Nathan Brady (Hamacher-Brady et al., 2006). Las células H9c2 transfectadas establemente se sembraron en placas de 12 pocillos un día antes de la transfección, que se hizo utilizando la construcción LC3:GFP y Lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El medio se cambió 6 horas después de la transfección, con DMEM+10 % FCS (medio completo) y se incubaron durante 24 horas. A continuación, para los grupos de control se administró el medio completo y para los grupos de privación se cambió el medio con DMEM (sin glucosa + sin FCS) para inducir la autofagia. 24 horas después se recolectaron las células y se capturaron en un Canto BD para el análisis FACS. Los datos del FACS se analizaron utilizando el software FlowJo.

**1.19 Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChiP) por FoxO3**

La inmunoprecipitación de cromatina por FoxO3 en las células H9c2 se llevaron a cabo con el Sistema de Inmunoprecipitación de Cromatina MAGnify™ (Invitrogen). En resumen, se utilizaron 200.000 células para entrecruzamiento con formaldehído. Se llevó a cabo la inmunoprecipitación con 5 µg de anticuerpos FoxO3 (sc-9813X, Santa Cruz) o anticuerpo de control (sc-2028, Santa Cruz). Se llevó a cabo posteriormente un análisis RT-PCR de la cromatina inmunoprecipitada aplicando cebadores como se representa en la Tabla 3.

**2. Resultados**

La significación funcional de la re-expresión de ciertos miARN en la enfermedad cardíaca no se entiende bien. Con el fin de determinar los miARN individuales que inducen la hipertrofio en cardiomiocitos, los inventores transfectaron cardiomiocitos de rata recién nacida con una biblioteca de precursores de miARN y estudiaron en paralelo los cambios en el tamaño de los cardiomiocitos y la secreción de péptido natriurético cerebral (BNP), que es un marcador de hipertrofia de cardiomiocitos. Utilizando un umbral de más del 20 % de inducción de tamaño de cardiomiocitos, los inventores identificaron 26 miARN pro-hipertróficos expresados en cardiomiocitos, de los cuales diez miARN (miR-19a, miR-19b, miR-22, miR-26, miR-132, miR-194, miR-195, miR-212, miR-365, miR-668) inducían también una fuerte secreción del marcador de estrés cardíaco BNP (por encima de la media). De manera interesante, el efecto más fuerte sobre la hipertrofia de cardiomiocitos se veía después de la sobre-expresión de miR-212, que junto con el miR-132 comprende la familia conservada evolutivamente miR-212/132 de miARN (Figura 1a).

**2.1 Los miARN que inducían hipertrofia, miR-212 y miR-132, son suficientes y necesarios para la inducción de hipertrofia de cardiomiocitos *in vitro***

Basándose en la exploración de la biblioteca inicial de miARN de los inventores, se enfocaron en la función cardíaca de la familia miR-212/132. Los experimentos de validación confirmaron que la sobre-expresión de pre-miR-212 o pre-miR-132 da lugar a un aumento del tamaño celular tanto en cardiomiocitos neonatales primarios y en líneas celulares de cardiomiocitos (H9c2, HL-1) (Figura 1b, 1c y Figuras 2a, 2d), indicando que tanto el miR-212 como el miR-132 son suficientes independientemente para inducir la hipertrofia. Además, la co-transfección de pre-miR-212 y pre-miR-132 demostraba efectos aditivos sobre el tamaño de cardiomiocitos. La inactivación de estos miARN con inhibidores de miARN específicos en cardiomiocitos primarios y líneas celulares de cardiomiocitos disminuía el tamaño celular (Figuras 1b, 1c y Figuras 2b, 2e) indicando que no solamente son suficientes, sino también necesarios para el aumento fisiológico de los cardiomiocitos.

Los niveles de expresión de miR-212 y miR-132 estaban regulados positivamente en cardiomiocitos primaros al tratarlos con diferentes estímulos hipertróficos, tales como la angiotensina 2 (Ang2), factor de crecimiento tipo insulina -1 (IGF-1), fenilefrina/isoprenalina (P/I) y suero bovino fetal (FCS), sugiriendo que la familia miR-212/132 está funcionalmente implicada en los procesos hipertróficos inducidos por diferentes rutas pro-hipertróficas *in vitro* (Figura 1d). Para determinar si la familia miR-212/132 también estaría regulada positivamente en afecciones hipertróficas *in vivo*, los inventores indujeron estrés cardíaco en ratones tipo silvestre mediante constricción transaórtica (TAC) y se demostró que los niveles de expresión cardíaca de miR-212 y miR-132 aumentaban durante la hipertrofia cardíaca (Figura 1e). Es de señalar que esta regulación positiva era paralela con el desarrollo de la hipertrofia cardíaca después de la sobrecarga de presión, que es evidente por el aumento del diámetro de cardiomiocitos en estos corazones (Fig. 1f). Para determinar qué tipos celulares del corazón contribuían principalmente a esta hipertrofia inducían la regulación positiva de miR-212 y miR-132 *in vivo*, los inventores utilizando experimentos de fraccionamiento celular utilizando corazones de ratones operados en falso y de TAC (5 semanas tras la TAC). Los resultados de los inventores indicaban un aumento significativo en los niveles de expresión de miR-212 y miR-132 en cardiomiocitos aislados, pero no en fibroblastos cardíacos (Fig. 1g, h).

En conjunto, estos resultados demuestran que la expresión de la familia miR-212/132 está inducida en cardiomiocitos durante la hipertrofia tanto *in vitro* como *in vivo*. Tanto el miR-212 como el miR-132 demostraron que eran necesarios y suficientes para la inducción de hipertrofia en cardiomiocitos *in vitro*.

Para aclarar adicionalmente los papeles funcionales de la familia miR-212/132 en cardiomiocitos, los inventores generaron líneas celulares transgénicas de H9c2 estables que sobre-expresaban miR-212/132 (aproximadamente con un aumento de 10 veces; Figura 3a) bajo un promotor CMV activo constitutivamente. Las líneas células H9c2 transgénicas adicionales se generaron como control utilizando la construcción similar pero excluyendo la secuencia codificante de miR-212/132. En las líneas celulares transgénicas, la sobre-expresión de miR-212/132 aumentaba la media de tamaño celular (Figura 2c) así como la tasa de crecimiento en el cultivo (Figura 3b). Para investigar la causa de las mayores tasas de crecimiento en células H9c2 que sobre-expresan miR-212/132, los inventores analizaron adicionalmente la proliferación de los índices apoptóticos. En comparación con los controles la sobre-expresión de miR-212/132 da lugar a una disminución en el número de células apoptóticas (Figura 3c) en ambas condiciones de FCS alto y bajo. Sin embargo, la proliferación celular no estaba afectada por la sobre-expresión de miR-212/132 (Figura 3d), indicando que las mayores tasas de crecimiento celular que se observaba en células H9c2 que sobre-expresaban miR-212/132 era debido a la disminución de eventos apoptóticos más que a un aumento de proliferación. Estos resultados demuestran que la familia miR-212/132 regula tanto la apoptosis como el crecimiento hipertrófico de cardiomiocitos *in vitro*.

Con el fin de aclarar si la sobre-expresión de miR-212/132 es suficiente para inducir la hipertrofia cardíaca también *in vivo*, los inventores generaron una línea de ratón transgénico con sobre-expresión de miR-212/132 específica de cardiomiocitos bajo el control de un promotor α-MHC (Figura 4a). Los inventores obtuvieron y analizaron dos familias transgénicas diferentes (Fam23 y Fam43) que se originan de dos líneas fundadoras independientes. La sobre expresión específica de cardiomiocitos de miR-212/132 fue verificado por análisis RT-PCR en muestras de corazón,

riñón y cerebro obtenidas de los ratones de ambas familias transgénicas en comparación con las mismas camadas de tipo silvestre (Figura 4b y datos no mostrados). Los ratones transgénicos se criaron de acuerdo con la relación Mendeliana esperada y no presentaban defectos obvios la nacer. sin embargo, la esperanza de vida de estos ratones transgénicos se reducía a una media de 84 y 119 días para la Fam23 y Fam43, respectivamente (Figura 4c). Todos los ratones transgénicos de la Fam23 y Fam43 morían con signos clínicos de insuficiencia cardíaca grave a los 4 o 6 meses tras el nacimiento, respectivamente. De manera interesante, los niveles de miR-212 y miR-132 en la Fam23 eran 2 y 4 veces mayores en comparación con la Fam43, respectivamente. Por lo tanto, los mayores niveles de expresión de miR-212/132 se correlacionan con la disminución de supervivencia.

Los corazones explantados de ratones transgénicos estaban significativamente agrandados (Figura 4d). Los inventores cuantificaron las relaciones de peso cardíaco respecto al corporal de diferentes grupos de edad de ambas familias transgénicas en comparación con las mismas camadas de tipo silvestre y presentaban un aumento progresivo del peso cardíaco durante la adolescencia de los ratones transgénicos (Figura 4e y 5a). Los niveles de expresión de los marcadores de estrés cardíaco péptido natriurético auricular (ANP) y BNP estaban drásticamente aumentados en los corazones transgénicos (Figuras 5b y 5c), indicando el desarrollo de la insuficiencia cardíaca. Aunque el nivel de expresión de α-MHC no estaba alterado en los corazones transgénicos (Figura 5d), el nivel de β-MHC también estaba fuertemente aumentado en corazones transgénicos (Figura 5e), indicando la reactivación del programa genético 'fetal' y confirmando de esta manera la existencia de remodelación cardíaca patológica en estos ratones. El β-MHC es la isoforma de MHC, que normalmente se expresa altamente en corazones fetales y se reactiva en corazones insuficientes (Hill y Olson, 2008; Barry y Townsend, 2010). Además, los inventores observaron un aumento en los niveles de fosfo-Akt en corazones transgénicos que sobre-expresan miR-212/132 (Figura 5f). Sin embargo, probablemente es un efecto indirecto del desarrollo de hipertrofia cardíaca en estos ratones más que ser la consecuencia directa de sobre-expresión de miR-212/132, ya que los niveles de fosfo-Akt no cambiaban en células H9c2 que sobre-expresan miR-212/132 *in vitro* (Figura 5g).

Morfológicamente, el diámetro de los cardiomiocitos se determinó en secciones histológicas de corazones transgénicos frente a los controles estaba significativamente aumentado (Figura 4f). La función cardíaca en ratones transgénicos se evaluó en comparación con las mismas camadas de tipo silvestre por ecocardiografía de pequeños animales (Figuras 4g-i). Los inventores observaron una significativa dilatación ventricular izquierda sistólica final y diastólica final en animales transgénicos (Figuras 4g y 4h). El acortamiento fraccional, un parámetro de la función cardíaca, estaba fuertemente reducida en corazones de ratones transgénicos en comparación con las mismas camadas de tipo silvestre (Figura 4i). Las evaluaciones hemodinámicas básicas confirmaban una función cardíaca alterada de los animales transgénicos (Tabla 1).

En conjunto, estos resultados demuestran que la sobre-expresión de la familia miR-212/132 específica de cardiomiocitos en ratones es suficiente para inducir una hipertrofia cardíaca patológica que resulta en el desarrollo de insuficiencia cardíaca.

Para analizar los papeles potencialmente conservados *in vivo* de la familia miR-212/132 en otras especies, los inventores inyectaron precursores de miR-212 y miR-132 en embriones de pez cebra. A las 48 horas después de la fertilización (hpf), los embriones mostraban un edema cardíaco masivo indicando una disfunción cardíaca (Figura 5h). Estos resultados apuntan a un papel funcional conservado evolutivo de la familia miR-212/132 en la regulación de la función cardíaca.

**2.4 La familia miR-212/132 es necesaria tanto para el crecimiento cardíaco fisiológico como hipertrofia cardíaca patológica en ratones**

Los inventores generaron previamente una línea de ratón mutante con pérdida-de-función para miR-212/132 y demostraron que los ratones miR-212/132$^{-/-}$ se crían con la relación Mendeliana esperada y llevan una vida sana, aunque las hembras de ratones miR-212/132$^{-/-}$ presentan un desarrollo deficiente de la glándula mamaria durante la pubertad (Ucar et al., 2010, Ucar et al. 2011). Obviamente. lo ratones miR-212/132$^{-/-}$ también carecen de expresión cardíaca de miR-212/132 (Ucar et al., 2010). Los inventores han analizado ahora adicionalmente la línea de ratones miR-212/132$^{-/-}$ con el fin de determinar si miR-212/132 también es 'necesaria' para el crecimiento cardíaco fisiológico o la hipertrofia cardíaca patológica en ratones. La relación de peso cardíaco respecto al corporal de ratones miR-212/132$^{-/-}$ era un 12,3 % menor que la se las mismas camadas de tipo silvestre (Figura 6a), indicando la necesidad de miR-212/132 para el crecimiento cardíaco fisiológico. Además, los cardiomiocitos primarios aislados de los ratones miR-212/132$^{-/-}$ recién nacidos eran de tamaños celulares menores en comparación con los controles de las mismas camadas de tipo silvestre (Figura 6b). Sin embargo, funcionalmente no hay diferencias en los parámetros cardíacos de los ratones de tipo silvestre y nulos en miR-212/132 (Tabla 2).

Para determinar si se necesita miR-212/132 para la hipertrofia cardíaca patológica, los inventores aplicaron una sobrecarga ventricular izquierda por una operación TAC los ratones miR-212/132$^{-/-}$ y las mismas camadas de tipo silvestre. La TAC da lugar a un aumento significativo del peso cardíaco y los diámetros transversales de cardiomiocitos en animales de tipo silvestre (Figuras 6c y 6d). Por el contrario, los ratones mutantes que carecen de miR-212/132 estaban fuertemente protegidos de la hipertrofia inducida por TAC (Figuras 6c y 6d). La fibrosis cardíaca inducida por la TAC también estaba menos presente en corazones mutantes (Figura 6e). El peso del

pulmón aumentaba significativamente en los animales de tipo silvestre con la TAC, pero con mucho menos extensión en los ratones miR-212/132$^{-/-}$, indicando la prevención de la insuficiencia cardíaca (Figura 6f). Tres semanas después de la TAC, los ratones de tipo silvestre desarrollaban la dilatación ventricular izquierda y función cardíaca alterada como se muestra por el aumento del diámetro diastólico final y sistólico final y la disminución del acortamiento fraccional (Figuras 6g-i). Por el contrario, los ratones miR-212/132$^{-/-}$ estaban protegidos del desarrollo de dilatación cardíaca y la función ventricular izquierda alterada (Figuras 6g-i).

Estos resultados demuestran que la función de la familia miR-212/132 no solo es 'suficiente' para inducir la hipertrofia patológica del corazón, sino también es 'necesaria' para la hipertrofia tanto fisiológica como patológica *in vivo*.

Como los ratones nulos en miR-212/132 tienen una eliminación constitutiva del gen miR-212/132 en todos los tipos celulares, es necesario investigar si la pérdida-de-función de miR-212/132 en cardiomiocitos o células no cardiomiocitos del corazón es responsable del fenotipo cardioprotector observado. Utilizando los inhibidores de miARN específicos, los inventores ya habían demostrado que la anulación de miR-212 o miR-132 da lugar a una disminución del tamaño celular de cardiomiocitos primarios (Figura 1b, c) así como las líneas celulares de cardiomiocitos (Figura 2b, e). Para estudiar las funciones potenciales de la familia miR-212/132 en fibroblastos cardíacos, que representan la fracción principal de miocitos no cardíacos, los inventores inactivaron miR-132 y/o miR-212 *in vitro* y comprobaron los posibles efectos sobre la proliferación, apoptosis o comportamiento de estos fibroblastos. Los resultados de los inventores demostraron ningún efecto significativo en cualquiera de estos procesos sobre la pérdida-de-función de la familia miR-212/132 (Figura 7). A continuación, los inventores emplearon el ensayo de angiogénesis retiniana utilizando los ratones de tipo silvestre y nulos en miR-212/132 con el fin de identificar las implicaciones de la pérdida-de-función de miR-212/132 para la angiogénesis general *in vivo*.

No se observaron diferencias entre los ratones de tipo silvestre y nulos en miR-212/132 en el tamaño de la retina, número de arterias retinianas, tamaño de la arteria central o el número de ramas por arteria (Figura 8a-c). Además, los inventores analizaron las densidades capilares en los corazones de ratones de tipo silvestre y nulos en miR-212/132 pero tampoco encontraron diferencias significativas (Figura 8d).

En conjunto, el fenotipo cardioprotector observado en los ratones nulos en miR-212/132 se debe probablemente a la pérdida-de-función de la familia miR-212/132 en cardiomiocitos más que en otras células no cardiomiocitos del corazón.

**2.5 MiR-212 y miR-132 inducen hipertrofia cardíaca mediante la regulación negativa de la transcripción del factor FoxO3 anti-hipertrófico**

Con el fin de aclarar las funciones moleculares de la familia miR-212/132 en la regulación de la hipertrofia cardíaca, los inventores investigaron las dianas corriente abajo de miR-212/132 que pueden estar implicadas en los cambios fenotípicos que se observan después de la modulación genética de esta familia de miARN. Los inventores exploraron en primer lugar los genes diana previstos de miR-212 y miR-132 utilizando distintas herramientas bioinformáticas, tales como Miranda, Targetscan, y PicTar, para identificar los genes asociados con hipertrofia. Los inventores identificaron que la transcripción del factor FoxO3 anti-hipertrófico era una diana prevista para miR-212 y miR-132. Para validar esta predicción bioinformática, los inventores clonaron la 3'UTR de FoxO3 corriente abajo del gen de la luciferasa de luciérnaga y descubrieron que la actividad de luciferasa normalizada estaba sustancialmente reducida al co-transfectar esta construcción con miR-212 o miR-132 pero no con miARN (desordenado) no relacionado de control. (Figura 9a). La mutación del sitio de unión de miR-212/132 en la 3'UTR de FoxO3 abolía los efectos represores de miR-212 y miR-132 (Figura 9a). Estos resultados validaban el FoxO3 como una diana directa *in vivo* de miR-212 y miR-132.

Los inventores analizaron entonces los niveles de expresión fe FoxO3 en corazones de ratones transgénicos con sobre-expresión de miR-212/132 específica de cardiomiocitos y descubrieron una expresión reducidas de los niveles tanto de ARN como proteico cuando se comparaban los corazones de las mismas camadas de tipo silvestre (Figuras 9b y 9c). La sobre-expresión de miR-212/132 también resulta en niveles de FoxO3 más bajos en H9c2 y cardiomiocitos primarios (Figuras 10a, b) El tratamiento con fenilefrina pro-hipertrófica de los cardiomiocitos daba lugar a regulación negativo de la expresión de FoxO3, que podría rescatarse por inhibición de miR-212 o miR-132 (Figura 9d), indicando que la regulación negativa de expresión FoxO3 inducía hipertrofia además está mediada por la familia miR-212/132. De manera interesante, los inventores también demostraron previamente una asociación entre una disminución de los niveles de ARNm de FoxO3 e insuficiencia cardíaca humana (Thum et al., 2007) indicando un parecido significativo del fenotipo observado con la insuficiencia cardíaca humana también a nivel molecular.

Los factores de transcripción FoxO ejercen sus funciones anti-hipertróficas sobre todo mediante la supresión de la ruta de señalización de calcineurina (Ni et al., 2006; Ronnebaum y Patterson, 2010). El FoxO3 puede activar la expresión de atrogin-1 que induce la ubiquitinación y por lo tanto la degradación de calcineurina A en los cardiomiocitos (Sandri et al., 2004; Li et al., 2004). Por lo tanto, los inventores analizaron los niveles de expresión de atrogin-1 en corazones de ratones transgénicos que sobre-expresan miR-212/132 y descubrieron una reducción

significativa en comparación con los corazones de tipo silvestre (Figura 9e). Debido a que la regulación negativa de FoxO3 dependiente de miR-212/132 y posteriormente de la expresión de atrogin-1, los inventores hicieron la hipótesis de que la actividad de la ruta de señalización de calcineurina estaría aumentada en los corazones de ratones transgénicos que sobre-expresan miR-212/132. Los inventores determinaron de esta manera la expresión del ARNm MCIP.1 (también conocido como Mcip1.3, RCAN1), cuya transcripción está regulada directamente por la ruta de señalización de calcineurina (Rothermel et al., 2003). Los inventores descubrieron que los niveles de ARNm de MCIP.1 estaban significativamente aumentados en corazones transgénicos en comparación con los controles de tipo silvestre (Figura 9f) así como en las líneas celulares H9c2 transgénicas que sobre-expresan miR-212/132 (Figura 10c). Además, la actividad de la calcineurina desfosfatasa estaba aumentada en lisados cardíacos de ratones transgénicos miR-212/132, confirmando de esta manera la hiperactividad de esta ruta de señalización pro-hipertrófica (Figura 9g). El efecto pro-hipertrófico de la ruta de señalización de la calcineurina está mediada principalmente por la activación de los factores de transcripción NFAT mediante la des-fosforilación, que da lugar a su activación y transporte nuclear (Okamura et al., 2000; Barry y Townsend, 2010). Por lo tanto, los inventores también comprobaron el nivel de actividad transcripcional NFAT en cardiomiocitos después de la transfección con pre-miR-212, pre-miR-132, o miARN control desordenados. La sobre-expresión de miR-212 o miR-132, pero no del miARN de control, dan lugar a un aumento dramático en la actividad de NFAT en condiciones pro-hipertróficas tanto basales como inducidas por fenilefrina (PE) (Figura 9h).

Por el contrario, la regulación positivo de Mcip1.4 después de la sobrecarga de presión se mitigaba en ratones nulos a miR-212/132 (Figura 9i), indicando que la activación de la señalización pro-hipertrófica calcineurina/NFAT estaba suprimida en ausencia de función de miR-212/132. Además, los niveles de atrogin-1 estaban disminuidos durante la hipertrofia cardíaca inducida por sobrecarga de presión en corazones de tipo silvestre, pero aumentaba en corazones nulos a miR-212/132 (Figura 9k), indicando la falta de función FoxO3 y por lo tanto explica la supresión de señalización de calcineurina en corazones mutantes.

En conjunto, estos resultados indican que la familia miR-212/132 regula el equilibrio entre las rutas pro- y anti-hipertróficas en cardiomiocitos mediante su regulación directa de la expresión de FoxO3. En ausencia de inhibición mediada por FoxO3, la hiperactivación de la ruta de señalización de calcineurina pro-hipertrófica y consecuentemente el aumento de la actividad transcripcional de NFAT daba lugar probablemente a la hipertrofia patológica observada y la insuficiencia cardíaca asociada en los ratones transgénicos con sobre-expresión de miR-212/132. Por otra parte, en ausencia de función de miR-212/132, la actividad de FoxO3 no suprimida da lugar a la regulación positiva de atrogin-1 y de esta manera previene la activación de la señalización de calcineurina pro-hipertrófica y de esta manera el desarrollo de hipertrofia cardíaca.

**2.6 Las funciones de la familia miR-212/132 como un factor anti-autofágico en cardiomiocitos**

Aparte de la regulación negativa de los procesos hipertróficos, el FoxO3 también induce la autofagia en cardiomiocitos (Sengupta et al., 2009; Ferdous et al., 2010). Para determinar si la sobre-expresión de miR-212/132 en cardiomiocitos puede interferir en procesos autofágicos *in vivo*, los inventores investigaron los niveles de ARNm de varios genes marcadores autofágicos como LC3b, Ulk2, ATG12, Plk3c3, Beclin1, Bnip3, y ATG5b y descubrieron una disminución dramática de la expresión de todos estos genes en corazones transgénicos en comparación con los niveles en corazones de tipo silvestre (Figura 11a). De la misma manera, los niveles de lipidación de LC3 (relaciones LC3II/LC3I) eran menores (Figura 11b), mientras que los niveles del sustrato de autofagia p62 estaban aumentados en corazones de ratones transgénicos que sobre-expresan miR-212/132 (Figura 11c).

Estos resultados sugieren que la sobre-expresión de miR-212/132 específica de cardiomiocitos atenúa los procesos autofágicos cardíacos. Por el contrario. los corazones de ratones nulos a miR-212/132 tienen lipidación de LC3 cardíaco mayor (relaciones LC3II/CL3I) y menores niveles de p62 cuando se comparan con corazones de tipo silvestre (Figuras 11b y c), indicando altas tasas de autofagia en el corazón.

Con el fin de determinar si la expresión reducida de marcadores de autofagia que se observa en los corazones de ratones transgénicos es un efecto directo de la sobre-expresión de miR-212/132, los inventores analizaron los procesos autofágicos en líneas celulares H9c2 transgénicas transfectadas establemente. Para visualizar la formación de autofagosomas y cuantificar la cantidad de estructuras autofágicas en los cardiomiocitos individuales, los inventores transfectaron estas células con una construcción de expresión para la proteína de fusión LC3:mCherry. La proteína LC3 se lipidó y encones se acumula en las estructuras de membrana de autofagosomas y por lo tanto es posible visualizar las estructuras autofágicas como puntos fluorescentes (Hamacher-Brady et al., 2006). En condiciones normales, el número medio de puntos LC3 era ligeramente menor en las células H9c2 que sobre-expresan miR-212/132 en comparación con los controles (Figuras 11d y 11e). La privación de suero y glucosa induce una alto nivel de autofagia en esta línea celular (Aki et al., 2003). Por lo tanto, los inventores también indujeron las condiciones autofágicas privando las células en medio libre de suero y glucosa y se cuantificó el número de puntos LC3 en células individuales. Aunque el número medio de puntos LC3 aumentaba 3 veces con la privación en células de control, casi no cambiaba en células H9c2 transgénicas que sobre-expresan miR-212/132, indicando que la familia miR-212/132 de miARN regula negativamente la inducción autofágica en respuesta a la limitación de nutrientes (Figuras 11d y 11e).

También se observaron hallazgos similares en cardiomiocitos primarios neonatales en privación y sobre-expresión de miR-212 o miR-132 (Figura 12). Estos resultados demuestran que la familia miR-212/132 regula negativamente la respuesta autofágica de los cardiomiocitos a la limitación de nutrientes.

Con el fin de visualizar las estructuras autofágicas con más detalle, los inventores utilizaron la microscopía de transmisión de electrones para analizar las mismas líneas celulares transgénicas en las mismas condiciones anteriores y se hizo el recuento del número de vacuolas autofágicas con membranas dobles. De manera similar a los datos de puntos LC3 de los inventores, la respuesta autofagia a la limitación de nutrientes estaba mitigada en células H9c2 que sobre-expresan miR-212/132 en comparación con el aumento de casi 2 veces del número de vacuolas autofágicas en células de control (Figuras 11f y 11g). Finalmente, los inventores emplearon también un método basado en FACS para la detección cuantitativa del flujo autofágico tomado como la actividad de la maquinaria autofágica (Shvets y Elazar, 2009). Las células H9c2 transgénicas se transfectaron con las construcciones de expresión GFP:LC3 y se analizaron en la condición de medio completo o condiciones de privación de suero/glucosa. La disminución de la fluorescencia de GFP se correlacionaba con los niveles de actividad de la maquinaria autofágica, ya que la intensidad de fluorescencia de GFP disminuye con el ambiente ácido de autolisosomas después de la fusión de los lisosomas con autofagosomas. Los inventores han detectado una disminución significativa de la intensidad de GFP para la línea celular H9c2 control después de la privación en comparación con las condiciones del medio completo, indicando que el aumento de la actividad autofágica como resultado de la limitación de nutrientes. Por el contrario, para la línea celular H9c2 transgénica que sobre-expresa miR-212/132 esta disminución de la intensidad de GFP estaba significativamente reducida (Figuras 11h y 11i), que también confirma los hallazgos previos de los inventores observados en los análisis de microscopía de fluorescencia y electrónica. Es de señalar, que los niveles de la proteína de fusión GFP:LC3 eran similares entre las células H9c2 de control y que sobre-expresan miR-212/132 en condiciones experimentales similares, aunque había una reducción con la privación en el mismo nivel de ambos grupos como se esperaba debido a la eliminación autofágica de proteínas LC3 (Figura 13). Por lo tanto, la diferencia de fluorescencia de GFP entre las células H9c2 de control y las que sobre-expresan miR-212/132 se debe probablemente a la reducción de la fluorescencia de GFP con los autolisosomas como se ha explicado anteriormente.

Tomados en conjunto, los inventores han demostrado, utilizando tres métodos independientes, que familia miR-212/132 funciona como un factor anti-autofágico en cardiomiocitos, que puede mitigar los mecanismos autofágicos en condiciones de limitación de nutrientes con su sobre-expresión.

Con el fin de determinar si los hallazgos de los inventores demostraban un mecanismo biológicamente significativo en cardiomiocitos más que la mera consecuencia del alto nivel de sobre-expresión de los dos microARN, los inventores comprobaron los niveles de expresión de ambos miR-212 y miR-132 en células H9c2 de tipo silvestre en condiciones normales y de privación de suero/glucosa. Los resultados de la RT-PCR cuantitativa mostraban que los niveles de ARNm maduro de ambos miR-212 y miR-132 estaban significativamente reducidos durante las condiciones de privación en comparación con las condiciones normales (Figura 14). Este resultado indica que durante la limitación de nutrientes, los cardiomiocitos regulan negativamente la expresión de miR-212 y miR-132, que son anti-autofágicos, lo que puede representar un mecanismo facilitado por estas células para aumentar el nivel de autofagia para sobrevivir durante las condiciones de privación.

Para estudiar el impacto potencial de la familia miR-212/132 en la respuesta autofágica a la privación *in vivo*, los inventores llevaron a cabo experimentos de privación adicionales utilizando ambas líneas de ratón mutantes miR-212/132 con perdida-de y ganancia-de función (Figura 15a). Como se evalúa por los niveles de lipidación LC3, la privación da lugar a un aumento drástico de la autofagia cardíaca en ratones tipo silvestre, que estaba significativamente atenuada en los animales transgénicos que sobre-expresan miR-212/132 específicos de cardiomiocitos (Figura 15b). De manera interesante, con la privación los niveles de autofagia aumentaban los niveles comparables en corazones de ratón de tipo silvestre y nulos en miR-212/132 ($^{-/-}$) (Figura 15 b). Para evaluar las estructuras autofágicas a nivel ultra-estructural, los inventores analizaron estas muestras de corazón también por microscopía de transmisión de electrones (Figura 15c y Figura 16). En condiciones normales de 'alimentación', los inventores observaron un número más alto de vacuolas autofágicas en los cardiomiocitos de ratones nulos en miR-212/132 que en los ratones de tipo silvestre, indicando niveles basales aumentados de autofagia en ausencia de la familia miR-212/132. La privación inducía un aumento drástico en el número de vacuolas autofágicas en cardiomiocitos de tipo silvestre, que alcanzaban un nivel similar o ligeramente aumentado del número de vacuolas autofágicas en cardiomiocitos de ratones nulos en miR-212/132 privados.

Por otro lado, en los cardiomiocitos de ratones transgénicos que sobre-expresan miR-212/132 los inventores observaron un número muy bajo de vacuolas autofágicas y los autofagosomas electrodensos en condiciones normales, que solamente aumentaban ligeramente en condiciones de privación. Este resultado confirma también que los niveles de autofagia basal e inducida por privación están mitigados en cardiomiocitos con sobre-expresión de miR-212/132.

A continuación, los inventores analizaron de la autofagia del sustrato p62 en condiciones de privación tanto *in vitro* como *in vivo*. Sorprendentemente, la limitación de nutrientes inducía una regulación positiva de los niveles de p62 tanto en células H9c2 de tipo silvestre como las que sobre-expresan miR-212/132 aunque los niveles de regulación

positivas eran menores en las células que sobre-expresaban miR-212/132 (Figura 17a). DE la misma manera, con la privación, los niveles de p62 también estaban aumentados en los corazones de ratones de tipo silvestre y nulos a miR-212/132 (Figura 17b). Por otro lado, los niveles de p62 se mantenían sin cambios en los corazones de ratones transgénicos que sobre-expresan miR-212/132 con la privación. P62 es una proteína de unión a LC3, que regula la formación de agregados proteicos y se elimina por autofagia (Kanamori et al., 2011). La respuesta autofágica a la limitación de nutrientes también se controla por la actividad de mTOR (Jung et al., 2010). En condiciones de nutrientes en exceso en el ambiente, la AMPK activa el mTOR, que a su vez suprime la autofagia y aumenta los niveles de proteína en la célula.

Por el contrario, la actividad de mTOR, revelada por los niveles de fosfo-mTOR, disminuye en condiciones de privación que permite la regulación positiva de la autofagia y la supresión de niveles proteicos en la célula. Para evaluar el impacto potencial de la función de la familia miR-212/132 en los niveles de actividad mTOR, los inventores analizaron los niveles de fosfo-mTOR en las células H9c2 transgénicas de los inventores *in vitro* y los corazones de ratones que sobre-expresan miR-212/132 específicos de cardiomiocitos privados. En las células H9c2 de tipo silvestre, la privación da lugar a la reducción de los niveles de fosfo-mTOR/mTOR (Figura 15d), que está de acuerdo con el aumento de autofagia en estas células. Por el contrario. los inventores observaron solo una disminución ligera pero no significativa en células H9c2 que sobre-expresan miR-212/132 privadas (Figura 15d), lo que apoya también los hallazgos previos de los inventores de una respuesta autofágica mitigada en estas células.

De igual manera, en los corazones se los ratones privados los niveles de fosfo-mTOR/TOR disminuían drásticamente, aunque el nivel de regulación negativa era menor en corazones transgénicos que sobre-expresan miR-212/132, demostrando un apoyo adicional del fenotipo de respuesta autofágica atenuada *in vivo* debido a la sobre-expresión de la familia miR-212/132 (Figura 15e).

Se había demostrado que la ruta IGF-1/PI3K y FoxO3 eran reguladoras principales de la autofagia en cardiomiocitos con la privación (Aki et al., 2003; Sengupta et al., 2009). Aquí, los resultados de los inventores demuestran que la familia miR-212/132 de miARN, que pueden estar reglados positivamente por la ruta IGF-1 (Figura 1d) y suprime la expresión de FoxO3 (Figura 9a-c), da lugar a autofagia alterada en cardiomiocitos y crecimiento hipertrófico.

Los inventores llevaron a cabo ensayos para validar si la función anti-autofágica de la familia miR-212/132 está relacionada con la supresión de FoxO3 mediada por miR-212/132. Además, con el FoxO3 ChiP se podía amplificar significativamente menos región promotora LC3b del ADN de células que sobre-expresan miR-212/132 en comparación con las células H9c2 de tipo silvestre (Figura 18a). Esto era paralelo con la menor expresión de LC3b en la línea celular transgénica que sobre-expresa miR-212/132 durante la privación en comparación con los controles (Figura 18b). Estos resultados demuestran que la función autofágica de la familia miR-212/132 está mediada al menos en parte por su regulación de la expresión de FoxO3.

Tomados en conjunto, los resultados de los inventores demuestran que miR-212/132 actúa como un factor anti-autofágico en cardiomiocitos mediante la regulación de la expresión de FoxO3. La sobre-expresión de miR-212/132 atenúa la repuesta autofágica inducida por privación en cardiomiocitos tanto *in vitro* como *in vivo*. Por otro lado la pérdida de función de miR-212/132 aumenta los niveles basados de autofagia en el corazón.

**2.7 Inhibición farmacológica de miR-132 *in vivo* con antagomires específicos que ofrece una estrategia terapéutica para la insuficiencia cardíaca inducida por la sobrecarga de presión**

Como la ganancia-de-función de la familia miR-212/132 inducía hipertrofia y respuesta autofágica mitigada en cardiomiocitos y la pérdida-de-función recuperaba la hipertrofia cardíaca inducida por sobrecarga de presión en ratones, los inventores hicieron la hipótesis de que la inhibición de miR-212 o miR-132 utilizando antagomires específicos puede evitar el desarrollo de insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión. Para ensayar esta hipótesis, los inventores primero indujeron una hipertrofia cardíaca en ratones tipo silvestre por TAC y se inyectaron por vía intravenosa con antagomires específicos contra miR-132. Como se muestra por RT-PCR cuantitativa, los niveles de miR-132 cardíacos endógenos se anularon satisfactoriamente en los ratones tratados con el antagomir contra miR-132 pero no con un antagomir contra una secuencia desordenada (Figura 19). Las relaciones de peso cardíaco respecto a corporal así como los diámetros de cardiomiocitos estaban significativamente aumentado en los animales tratados de control después de la sobrecarga de presión, pero menos afectados en los ratones tratados con antagomir-132 (Figuras 20a y 20b). Además, los ratones tratados con antagomir-132 mostraba menos aumento en fibrosis cardíaca (Figura 20c). Además, la función y dilatación cardíaca se conservaba mejor en los ratones tratados con antagomir-132 en comparación con el grupo tratado de control (Figuras 20d-f). En los corazones de estos ratones, la expresión de FoxO3 estaba inducida significativamente en el tratamiento con antagomir-132 en comparación con el tratamiento de control (Figura 20 g). Además, el aumento inducido por TAC de la actividad de calcineurina y la expresión de Mcip1.4 estaba atenuado después del tratamiento con antagomir (Figuras 20h, i).

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que al menos en los ratones, la anulación de miR-132 mediada por antagomir solo se puede utilizar para prevenir el desarrollo de hipertrofia cardíaca e insuficiencia cardíaca.

**3. Conclusión**

Los inventores han demostrado aquí que la familia miR-212/132 tiene un papel clave en la hipertrofia cardíaca y la insuficiencia cardíaca. Ambos miARN de la familia miR-212/132 están regulados positivamente por el estrés cardíaco *in vivo* y en condiciones hipertróficas *in vitro*. Los resultados de los inventores demostraban que miR-212 y miR-132 son ambos necesarios y suficientes para la hipertrofia patológica de cardiomiocitos *in vitro* e hipertrofia cardíaca *in vivo*. Las líneas de ratones transgénicos que sobre-expresaban miR-212/132 desarrollaban hipertrofia cardíaca y posteriormente insuficiencia cardíaca. Un fenotipo similar también se observó en pez cebra, indicando una función conservada evolutivamente de la familia miR-212/132 en cardiomiocitos. Por otra parte, los ratones miR-212/132$^{-/-}$ estaban protegidos de la hipertrofia cardíaca patológica inducida por sobrecarga de presión. De manera similar, la inhibición farmacológica del miR-132 por inyección de antagomir bloqueaba la hipertrofia cardíaca y el desarrollo de insuficiencia cardíaca.

Los resultados de los inventores muestran que tanto el miR-212 como el miR-132 se dirigen y regulan negativamente la expresión del factor de transcripción FoxO3, un potente factor anti-hipertrófico y pro-autofágico en cardiomiocitos (Sengupta et al., 2009; Ni et al., 2006). La regulación negativa de la expresión de FoxO3 con la sobre-expresión de miR-212/132 da como resultado la hiperactivación de la ruta de señalización de calcineurina y actividad transcripcional de NFAT, que posteriormente da lugar a la hipertrofia de cardiomiocitos tanto *in vitro* como *in vivo*. La regulación negativa de la expresión de FoxO3 puede mitigar también la respuesta autofágica de cardiomiocitos con el fin de superar las condiciones de privación. Por otra parte, la pérdida-de función genética de la familia miR-212/132 o la inactivación medida por antagomir del miR-132 suprime la señalización calcineurina/NFAT hipertrófica inducida por sobre carga de presión y de esta manera atenúa el desarrollo de hipertrofia cardíaca.

Además, los inventores proporcionan pruebas de que la familia miR-212/132 regula la autofagia cardíaca, un proceso que está estrechamente unido a la homeostasis cardíaca. La sobre-expresión de la diana de miR-212/132 FoxO3 se ha demostrado que reduce el tamaño celular de cardiomiocitos y que induce a la autofagia cardíaca (Sengupta et al., 2009). Las condiciones con autofagia cardíaca reducida dan lugar a la acumulación de productos parcialmente degradados y a veces catabolitos tóxicos, que finalmente dan lugar a la insuficiencia cardíaca (Taneike et al., 2010). La autofagia cardíaca reducida se había asociado con la cardiomiopatía relacionada con la edad (Taneike et al., 2010).

Como la sobre-expresión de miR-212/132 específica de cardiomiocitos alteraba la autofagia *in vitro* e *in vivo* y daba lugar al desarrollo de insuficiencia cardíaca grave en ratones. es posible que la disfunción de los mecanismos de respuesta autofágica contribuya a la muerte cardíaca observada en esta línea transgénica de ratón.

La inhibición farmacológica de la regulación positiva de miR-132 aumentaba los niveles de FoxO3 y recuperaba la hipertrofia e insuficiencia cardíaca inducida por la sobrecarga de presión, proporcionando de esta manera una diana terapéutica valiosa para interferir con los procesos de autofagia asociados a la enfermedad.

Sin embargo, los resultados de los inventores no proporcionan un enlace mecánico entre la autofagia y la hipertrofia cardíaca, sino que más ben demuestra dos funciones de la familia miR-212/132 en el corazón. Los cardiomiocitos son extremadamente sensibles a las condiciones de limitación de nutrientes y afrontan la privación activando sus mecanismos de respuesta autofágica. En este estudio, los inventores demostraron *in vitro* e *in vivo* que la familia miR-212/132 tiene una función anti-autofágica en cardiomiocitos, que puede atenuar esta respuesta autofágica inducida por la privación con su sobre-expresión. Por otra parte, los ratones con pérdida-de-función de miR-212/132 también muestran altos niveles de autofagia basal en condiciones normales.

Los miARN pueden regular varias dianas genéticas simultáneamente en una célula. En este estudio, los inventores demostraron que tanto el miR-212 y miR-132 puede regular directamente la expresión de FoxO3 que permitieron a los inventores demostrar los mecanismos moleculares que subyacen en los fenotipos de pérdida-de o ganancia-de-función observados en ambas estrategias. MiR-212/132 se expresa también en células no miocitos del corazón, aunque a niveles menores en comparación con los cardiomiocitos.

De manera importante, la regulación positiva de miR-212 y miR-132 inducida por hipertrofia se observó exclusivamente en los cardiomiocitos pero no en los fibroblastos cardíacos. Además, la modulación in vitro de la expresión de miR-212/132 no da lugar a ningún cambio fenotípico obvio en la proliferación, apoptosis o comportamientos migratorios de fibroblastos cardíacos. Los inventores tampoco fueron capaces de demostrar un defecto de la angiogénesis general o las densidades capilares en el corazón debido a la pérdida-de-función de la familia miR-212/132. Finalmente, como la sobre-expresión de miR-212/132 específica de cardiomiocitos muestra el fenotipo opuesto del fenotipo miR-212/132 con pérdida-de-función en ratones, es altamente probable que el efecto cardioprotector de la pérdida-de-función de miR-212/132 se deba a su función en los cardiomiocitos más que en células no miocitos del corazón. No obstante, los inventores no pueden descartar cualquier contribución menor de la pérdida-de-función de miR-212/132 en células no-miocitos da lugar parcialmente al fenotipo cardioprotector observado en estos ratones. Los inventores demostraron recientemente que FoxO3 regula parcialmente los niveles de miR-1 específicos de cardiomiocitos (Kumarswamy et al., 2012). Aquí, los inventores observaron una expresión de miR-1 cardíaco significativamente reducida en ratones y líneas celulares H9c2 transgénicos que sobre-expresan

miR-212/132 (Figura 21a y b), que puede contribuir también al fenotipo de insuficiencia cardíaca observado.

Específicamente, la inyección intravenosa de antagomires específicos contra el miR-132 recuperaba la hipertrofia cardíaca y la insuficiencia cardíaca posterior en ratones después de la sobrecarga de presión ventricular izquierda. Las opciones farmacológicas terapéuticas utilizadas actualmente de la insuficiencia cardíaca incluyen agentes moduladores de angiotensina, β-bloqueantes, diuréticos, antagonistas de aldosterona, vasodilatadores o agentes inotrópicos (Barry y Townsend, 2010). Aunque varios estudios clínicos han demostrado disminuciones significativas en las tasas de mortalidad inducida por insuficiencia cardíaca para todos estos agentes, la tasa de mortalidad a los 5 años se mantiene inaceptablemente a casi el 50 % (Barry y Townsend, 2010). Por tanto, existe una gran urgencia para desarrollar estrategias terapéuticas nuevas y más eficaces para la insuficiencia cardíaca. A este respecto, los hallazgos de los inventores utilizando la inyección intravenosa de antagomires contra miR-132 después de la inducción de sobrecarga de presión en ratones, que mostraban un resultado beneficioso y evitaban el desarrollo de insuficiencia cardíaca, ofrece una nueva estrategia terapéutica prometedora para la insuficiencia cardíaca inducida por sobrecarga de presión.

Utilizando ambas estrategias de ganancia-de y pérdida-de-función, este estudio demuestra que la familia miR-212/132 conservada evolutivamente ha conservado funciones pro-hipertróficas en el corazón y también demuestra que sus niveles de expresión apropiados fuertemente regulados son necesarios para el crecimiento y función fisiológica normal del corazón. Aunque la regulación de la autofagia por un miARN se había demostrado previamente para el miR-30 en líneas celulares cancerosas (Zhu et al., 2009), los hallazgos de los inventores representan el primer ejemplo de autofagia regulada por un miARN en una configuración *in vivo* y en un modelo patológico no tumoral. Por lo tanto, la familia miR-212/132 proporciona una percepción mecánica nueva y ofrece una diana terapéuticamente relevante para el tratamiento de la hipertrofia cardíaca y el desarrollo de la insuficiencia cardíaca.

**Tabla 1. Análisis básico hemodinámico de ratones de tipo silvestre (TS) y transgénicos (TG) que sobre-expresan miR-212/132 utilizando un sistema de catéter volumen-presión**

| **Parámetros hemodinámicos** | **TS (n = 3)** | **TG (n = 3)** |
|---|---|---|
| HR (lpm) | 506,05 ± 36,03 | 487,00 ± 54,35 |
| Ped (mmHg) | 2,05 ± 5,42 | 6,00 ± 3,30 |
| EF ( %) | 70,43 ± 9,71 | 38,36 ± 3,65 |

HR: frecuencia cardíaca; Ped: presión diastólica final ventricular izquierda; EF: fracción de eyección. Todos los valores representan la media ± S.E.M.; los valores de P son solo significativos (<0,05) para EF entre TS y TG.

**Tabla 2. Análisis hemodinámico de ratones de tipo silvestre (TS) y nulos a miR-212/132 (KO) utilizando un sistema de catéter volumen-presión**

| Parámetros hemodinámicos | TS (n = 8) | KO (n = 6) |
|---|---|---|
| HR (lpm) | 510,06 ± 10,05 | 527.05 ± 11.88 |
| SV (ml) | 16,43 ± 0,68 | 16.38 ± 0.54 |
| Ves (ml) | 16,45 ± 1,47 | 14.26 ± 1.59 |
| Ved (ml) | 31,26 ± 1,98 | 27.58 ± 2.60 |
| Pes (mmHg) | 87,38 ± 2,66 | 86.73 ± 3.05 |
| Ped (mmHg) | 3,83 ± 0,39 | 2.62 ± 1.06 |
| dP/dt máx (mmHg/s) | 8689,95 ± 424,21 | 9022.13 ± 645.49 |
| dP/dt mín (mmHg/s) | -8753,19 ± 451,06 | -9063.34 ± 416.60 |
| SW (mmHgml) | 1232,15 ± 54,49 | 1210.39 ± 58.67 |
| CO (ml/min) | 8337,05 ± 247,40 | 8622.58 ± 270.95 |
| EF ( %) | 54,65 ± 1,91 | 61.86 ± 4.57 |
| Ea (mmHg/ml) | 5,36 ± 0,35 | 5.37 ± 0.35 |
| Tau (ms) | 6,24 ± 0,35 | 5.75 ± 0.50 |

HR: frecuencia cardíaca; SV: volumen de choque; Ves/Pes: volumen/presión sistólica final ventricular izquierda; Ved/Ped: presión/volumen diastólica final ventricular izquierda; dP/dt: tasa de aumento de presión ventricular izquierda; SW: trabajo de choque; CO: gasto cardíaco; EF: fracción de eyección; Ea: elasticidad aórtica. Estadística: P no significativo entre TS y KO.

**Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos cebadores utilizados para los análisis de ARNm**

| Gen | Especie | Directo<br>Inverso | SEQ ID NO.: |
|---|---|---|---|
| Anp | Ratón | 5'-CCTGTGTACAGTGCGGTGTC-3' 5'-<br>CCTAGAAGCACTGCCGTCTC-3' | 10<br>11 |
| Bnp | Ratón | 5'-CTGAAGGTGCTGTCCCAGAT-3' 5'-<br>GTTCTTTTGTGAGGCCTTGG-3' | 12<br>13 |
| α-MHC | Ratón | 5'-GGTCCACATTCTTCAGGATTCTC-3' 5'-<br>GCGTTCCTTCTCTGACTTTCG-3' | 14<br>15 |
| β-MHC | Ratón | 5'-TCTCCTGCTGTTTCCTTACTTGCT-3' 5'-<br>CAGGCCTGTAGAAGAGCTGTACTC-3' | 16<br>17 |
| Gapdh | Ratón | 5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3' 5'-<br>GGCATGGACTGTGGTCATGA-3' | 18<br>19 |
| FoxO3 | Ratón | 5'-CAAAGCTGGGTACCAGGCTG-3' 5'-<br>TTCCACGGGTAAGGGCTTCA-3' | 20<br>21 |
| FoxO3 | Rata | 5'-GATGGTGCGCTGTGTGCCCTAC-3' 5'-<br>CCAAGAGCTCTTGCCAGTCCCTT-3' | 22<br>23 |
| LC3-región promotora (ChIP) | Rata | 5'-GGCTGGACTTGAATTCAGAAA-3' 5'-<br>ACTTGCTGTTCCAGGTGGTC-3' | 24<br>25 |
| Atrogin1 | Ratón | 5'-GCAAACACTGCCACATTCTCTC-3' 5'-<br>CTTGAGGGGAAAGTGAGACG-3' | 26<br>27 |
| Atrogin1 | Rata | 5'-CCATCAGGAGAAGTGGATCTATGTT-3'<br>5'-GTTCATGAAGTTCTTTTGGGCGATGC-3' | 28<br>29 |
| Mcip1 | Ratón | 5'-CTGCACAAGACCGAGTT-3'<br>5'-TGTTTGTCGGGATTGG-3' | 30<br>31 |
| Mcip1 | Rata | 5'-AGCTCCCTGATTGCCTGTGT-3'<br>5'-TTTGGCCCTGGTCTCACTTT-3' | 32<br>33 |
| Lc3b | Ratón | 5'-CGTCCTGGACAAGACCAAGT-3'<br>5'-ATTGCTGTCCCGAATGTCTC-3' | 34<br>35 |
| Ulk2 | Ratón | 5'-CAGCCCTGGATGAGATGTTT-3'<br>5'-GGATGGGTGACAGAACCAAG-3' | 36<br>37 |
| Atg12 | Ratón | 5'-GGCCTCGGAACAGTTGTTTA-3'<br>5'-CAGCACCGAAATGTCTCTGA-3' | 38<br>39 |
| Beclin1 | Ratón | 5'-GGCCAATAAGATGGGTCTGA-3'<br>5'-CACTGCCTCCAGTGTCTTCA-3' | 40<br>41 |
| Plk3c3 | Ratón | 5'-TGTCAGATGAGGAGGCTGTG-3'<br>5'-CCAGGCACGACGTAACTTCT-3' | 42<br>43 |
| Bnip3 | Ratón | 5'-GAACTGCACTTCAGCAATGG-3'<br>5'-ATTTCAGCTCTGTTGGTATC-3' | 44<br>45 |
| Atg5 | Ratón | 5'-GACAAAGATGTGCTTCGAGATGTG-3'<br>5'-ATAATGCCATTTCAGGGGTGTGC-3' | 46<br>47 |

**Referencias**

1. Aki, T.; Yamaguchi, K.; Fujimiya, T.; Mizukami, Y. (2003). Phosphoinositide 3-kinase accelerates autophagic cell death during glucose deprivation in the rat cardiomyocyte-derived cell line H9c2. Oncogene. 22, 8529-8535.
2. Alvarez-Saavedra, M.; Antoun, G.; Yanagiya, A.; Oliva-Hernandez, R.; Cornejo-Palma, D.; Perez-Iratxeta, C.; Sonenberg, N.; Cheng, H.Y. (2011). MiRNA-132 orchestrates chromatin remodeling and translational control of

circadian clock. Hum Mol Genet. 20, 731-751.
3. Barry, S.P.; Townsend, P.A. (2010). What causes a broken heart-Molecular insights into heart failure. Int Rev Cell Mol Biol 284, 113-179.
4. Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell. 136, 215-233.
5. Bauersachs, J.; Thum, T. (2007) MicroRNAs in the broken heart. Eur J Clin Invest. 37, 829-833.
6. Callis, T.E.; Pandya, K.; Seok, H.Y.; Tang, R.H.; Tatsuguchi, M.; Huang, Z.P.; Chen, J.F.; Deng, Z.; Gunn, B.; Shumate, J. et al. (2009) MicroRNA-208a is a regulator of cardiac hypertrophy and conduction in mice. J Clin Invest. 119, 2772-2786.
7. Cao, D.J.; Wang, Z.V.; Battiprolu, P.K.; Jiang, N.; Morales, C.R.; Kong, Y.; Rothermel, B.A.; Gillette, T.G.; Hill, J.A. (2011) Histone deacetylase (HDAC) inhibitors attenuate cardiac hypertrophy by suppressing autophagy. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 108, 4123-4128.
8. Chen, J.F.; Murchison, E.P.; Tang, R.; Callis, T.E.; Tatsuguchi, M.; Deng, Z.; Rojas, M.; Hammond, S.M.; Schneider, M.D.; Selzman, C.H. et al. (2008). Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 105, 2111-2116.
9. da Costa Martins, P.A.; Bourajjaj, M.; Gladka, M.; Kortland, M.; van Oort, R.J.; Pinto, Y.M.; Molkentin, J.D.; De Windt, L.J. (2008). Conditional dicer gene deletion in the postnatal myocardium provokes spontaneous cardiac remodeling. Circulation. 118, 1567-1576.
10. Datta, S.R.; Brunet, A.; Greenberg, M.E. (1999). Cellular survival: a play in three Akts. Genes Dev. 13, 2905-2927.
11. DeBosch, B.J.; Muslin, A.J. (2008). Insulin signaling pathways and cardiac growth. J Mol Cell Cardiol. 44, 855-864.
12. Ferdous, A.; Battiprolu, P.K.; Ni, Y.G.; Rothermel, B.A.; Hill, J.A. (2010) FoxO, autophagy, and cardiac remodeling. J Cardiovasc Transl Res. 3, 355-364.
13. Frescas, D.; Valenti, L.; Accili, D. (2005). Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt1-dependent deacetylation promotes expression of glucogenetic genes. J Biol Chem. 280, 20589-20595.
14. Glas, D.J. (2010). PI3 kinase regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. Curr Top Microbiol Immunol. 346, 267-278.
15. Gottlieb, R.A.; Mentzer, R.M. (2010). Autophagy during cardiac stress: joys and frustrations of autophagy. Annu Rev Physiol. 72, 45-59.
16. Gottlieb, R.A.; Gustafsson, A.B. (2011). Mitochondrial turnover in the heart. Biochim Biophys Acta. 1813, 1295-1301.
17. Hamacher-Brady, A.; Brady, N.R.; Gottlieb, R.A. (2006). Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes. J Biol Chem. 281, 29776-29787.
18. Hansen, K.F.; Sakamato, K.; Wayman, G.A.; Impey, S.; Obrietan, K. (2010). Transgenic miR-132 alters neuronal spine density and impairs novel object recognition memory. PloS One. 5, e15497.
19. Hentschel, D.M.; Mengel, M.; Boehme, L.; Liebsch, F.; Albertin, C.; Bonventre, J.V.; Haller, H.; Schiffer, M. (2007). Rapid screening of glomerular slit diaphragm integrity in larval zebrafish. Am J Physiol Renal Physiol. 293, F1746-F1750.
20. Hill, J.A.; Olson, E.N. (2008). Cardiac plasticity. N Engl J Med. 358, 1370-1380.
21. Jentzsch, C.; Leierseder, S.; Loyer, X.; Flohrschutz, I.; Sassi, Y.; Hartmann, D.; Thum, T.; Laggerbauer, B.; Engelhardt, S. (2011). A phenotypic screen to identify hypertrophy-modulating microRNAs in primary cardiomyocytes. J Mol Cell Cardiol, ido:10.1016/j.yjmcc.2011.07.010 (2011).
22. Li, H.H.; Kedar, V.; Zhang, C.; McDonough, H.; Arya, R.; Wang, D.Z.; Patterson, C. (2004). Atrogin-1/muscle atrophy F-box inhibits calcineurin-dependent cardiac hypertrophy by participating in an SCF ubiquitin ligase complex. J Clin Invest. 114, 1058-1071.
23. Liu, N.; Bezprozvannaya, S.; Williams, A.H.; Qi, X.; Richardson, J.A.; Bassel-Duby, R.; Olson, E.N. (2008). MicroRNA-133 regulates cardiomyocyte proliferation and suppresses smooth muscle gene expression in the heart. Genes Dev. 22, 3242-3254.
24. Magill, S.T.; Cambronne, X.A.; Luikart, B.W.; Lioy, D.T.; Leighton, B.H.; Westbrook, G.L.; Mandel, G.; Goodman, R.H. (2010). microRNA-132 regulates dendritic growth and arborization of newborn neurons in the adult hippocampus. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 107, 20382-20387.
25. McMullen, J.R.; Shioi, T.; Huang, W.Y.; Zhang, L.; Tarnavski, O.; Bisping, E.; Schinke, M.; Kong, S.; Sherwood, M.C.; Brown, J. et al. (2004). The insulin-like growth factor 1 receptor induces physiological heart growth via the phosphoinositide 3-kinase (p110alpha) pathway. J Biol Chem. 279, 4782-4793.
26. Ni, Y.G.; Berenji, K.; Wang, N.; Oh, M.; Sachan, N.; Dey, A.; Cheng, J.; Lu, G.; Morris, D.J.; Castrillon, D.H. et al. (2006). Foxo transcription factors blunt cardiac hypertrophy by inhibiting calcineurin signaling. Circulation. 114, 1159-1168.
27. Okamura, H.; Aramburu, J.; Garcia-Rodriguez, C.; Viola, J.P.; Raghavan, A.; Tahiliani, M.; Zhang, X.; Qin, J., Hogan, P.G.; Rao, A. (2000). Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a con forma-tional switch that regulates transcriptional activity. Mol Cell. 6, 539-550.
28. Rao, P.K.; Toyama, Y.; Chiang, H.R.; Gupta, S.; Bauer, M.; Medvid, R.; Reinhardt, F.; Liao, R.; Krieger, M.; Jaenisch, R. et al. (2009). Loss of cardiac microRNA-mediated regulation leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. Circ Res. 105, 585-594.
29. Ronnebaum, S.M.; Patterson, C. (2010). The foxO family in cardiac function and dysfunction. Annu Rev Physiol. 72, 81-94.
30. Rothermel, B.A.; Vega, R.B.; Williams, R.S. (2003). The role of modulatory calcineurin-interacting proteins in

calcineurin signaling. Trends Cardiovasc Med. 13, 15-21.
31. Sandri, M.; Sandri, C.; Gilbert, A.; Skurk, C.; Calabria, E.; Picard, A.; Walsh, K.; Schiaffino, S.; Lecker, S.H.; Goldberg, A.L. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. Cell. 117, 399-412.
32. Sayed, D.; He, M.; Hong, C.; Gao, S.; Rane, S.; Yang, Z.; Abdellatif, M. (2010). MicroRNA-21 is a downstream effector of Akt that mediates its antiapoptotic effects via suppression of Fas ligand. J Biol Chem. 285, 20281-20290. 33.Sengupta, A.; Molkentin, J.D.; Yutzey, K.E. (2009). FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomy-ocytes. J Biol Chem. 284, 28319-28331.
34. Shvets, E.; Elazar, Z. (2009). Flow cytometric analysis of autophagy in living mammalian cells. Methods Enzymol. 452, 131-141.
35. Skurk, C.; Izumiya, Y.; Maatz, H.; Razeghi, P.; Shiojima, I.; Sandri, M.; Sato, K.; Zeng, L.; Schiekofer, S.; Pimentel, D. et al. (2005). The FOXO3a transcription factor regulates cardiac myocyte size downstream of AKT signaling. J Biol Chem. 280, 20814-23.
36. Taegtmeyer, H.; Sen, S.; Vela, D. (2010). Return to fetal gene program: a suggested metabolic link to gene expression in the heart. Ann N Y Acad Sci. 1188, 191-198.
37. Taneike, M.; Yamaguchi, O.; Nakai, A.; Hikoso, S.; Takeda, T.; Mizote, I.; Oka, T.; Tamai, T.; Oyabu, J.; Murakawa, T. et al. (2010). Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy. Autophagy. 6, 600-606. 38.Thum, T.; Galuppo, P.; Wolf, C.; Fiedler, J.; Kneitz, S.; van Laake, L.W.; Doevendans, P.A.; Mummery, C.L.; Borlak, J.; Haverich, A. et al. (2007). MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. Circulation. 116, 258-267.
39. Thum, T.; Catalucci, D.; Bauersachs, J. (2008). MicroRNAs: novel regulators in cardiac development and disease. Cardiovasc Res. 79, 562-570.
40. Ucar, A.; Vafaizadeh, V.; Jarry, H.; Fiedler, J.; Klemmt, P.A.; Thum, T.; Groner, B.; Chowdhury, K. (2010). mir-212 and miR-132 are required for epithelial stromal interactions necessary for mouse mammary gland development. Nat Genet. 42, 1101-1008.
41. Ucar, A.; Vafaizadeh, V.; Chowdhury, K.; Groner, B. (2011). MicroRNA-dependent regulation of the microenvironment and the epithelial stromal cell interactions in the mouse mammary gland. Cell Cycle. 10, 563-565. 42.Valencia-Sanchez, M.A.; Liu, J.; Hannon, G.J.; Parker, G. (2006). Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. Genes Dev. 20, 515-524.
43. van Rooij, E.; Sutherland, L.B.; Qi, X.; Richardson, J.A.; Hill, J.; Olson, E.N. (2007). Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. Science. 316, 575-579.
44. van Rooij, E.; Quiat, D.; Johnson, B.A.; Sutherland, L.B.; Qi, X.; Richardson, J.A.; Kelm, R.J. Jr.; Olson, E.N. (2009). A family of microRNAs encoded by myosin genes governs myosin expression and muscle performance. Dev Cell. 17, 662-673.
45. Ventura, A.; Young, A.G.; Winslow, M.M.; Lintault, L.; Meissner, A.; Erkeland, S.J.; Newman, J.; Bronson, R.T.; Crowley, D.; Stone, J.R. et al. (2008). Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. Cell. 132, 875-886.
46. Wang, K.; Li, P.F. (2002). Foxo3a regulates apoptosis by negatively targeting miR-21. J Biol Chem. 285, 16958-16966.
47. Zhao, Y.; Ransom, J.F.; Li, A.; Vedantham, V.; von Drehle, M.; Muth, A.N.; Tsuchihashi, T.; McManus, M.T.; Schwartz, R.J.; Srivastava, D. (2007). Cell. 129, 303-317.
48. Zhu, H.; Wu, H.; Liu, X.; Li, B.; Chen, Y.; Ren, X.; Liu, C.G.; Yang, J.M. (2009). Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells. Autophagy. 5, 816-823.
49. Krützfeldt, J.; Rajewsky, N.; Braich, R.; Rajeev, K.G.; Tuschl, T.; Manoharan, M.; Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs'. Nature. 438, 685-689.
50. Merkle, S.; Frantz, S.; Schon, M.P.; Bauersachs, J.; Buitrago, M.; Frost, R.J.; Schmitteckert, E.M.; Lohse, M.J.; Engelhardt, S. (2007). A role for caspase-1 in heart failure. Circ Res. 100, 645-653.
51. Rockman, H.A.; Ross, R.S.; Harris, A.N.; Knowlton, K.U.; Steinhelper, M.E.; Field, L.J.; Ross, J. Jr.; Chien, K.R. (1991) Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an *in vivo* murine model of cardiac hypertrophy. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 88, 8277-8281. 52.Czech, M.P. (2006). MicroRNAs as Therapeutic Targets. New England J. Med. 354, 1194-1195. 53.Fiedler J.; Jazbutyte V.; Kirchmaier B.C.; Gupta S.K.; Lorenzen J.; Hartmann D.; Galuppo P.; Kneitz S.; Pena JT.; Sohn-Lee C.; Loyer X.; Soutschek J.; Brand T.; Tuschl T.; Heineke J.; Martin U.; Schulte-Merker S.; Ertl G.; Engelhardt S.; Bauersachs J.; Thum T. (2011) MicroRNA-24 Regulates Vascularity After Myocardial Infarction. Circulation. 124(6), 720-30.
54. Anker S.D. y Coats A.J. (1999) Cardiac cachexia: a syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation. Chest. 115(3):836-47.
55. Anker S.D., Ponikowski P., Varney S., Chua T.P., Clark A.L., Webb-Peploe K.M., Harrington D., Kox W.J., Poole-Wilson P.A., Coats A.J. (1997) Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. Lancet. 349(9058):1050-1053.
56. Nakai, A. et al. The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. Nat Med. 13, 619-624 (2007).
57. Chen, J.F. et al. Targeted deletion of Dicer in the heart leads to dilated cardiomyopathy and heart failure. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 105, 2111-2116 (2008).
58. da Costa Martins, P.A. et al. MicroRNA-199b targets the nuclear kinase Dyrk1a in an auto-amplification loop promoting calcineurin/NFAT signalling. Nat. Cell Biol. 12, 1220-1227 (2010).
59. Bauersachs, J. & Thum, T. Biogenesis and regulation of cardiovascular MicroRNAs. Circ Res. 109, 334-347

(2011).
60. Thum, T. et al. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signaling in fibroblasts. Nature 456, 980-984 (2008).
61. Komatsu, M. et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. Cell. 131,1149-1163 (2007).
62. Kanamori, H. et al. The role of autophagy emerging in postinfarction cardiac remodelling. Cardiovasc Res. 91, 330-339 (2011).
63. Jung, C.H., Ro, S.H., Cao, J., Otto N.M., Kim, D.H. mTOR regulation of autophagy. FEBS Lett. 584,1287-1295 (2010).
64. Kumarswamy, R., et al., SERCA2a gene therapy restores microRNA-1 expression in heart failure via an Akt/FoxO3A-dependent pathway. Eur Heart J. 33, 1067-1075 (2012).
65. Kanamori, H. et al. Functional significance and morphological characterization of starvation-induced autophagy in the adult heart. Am J Pathol. 174, 1705-1714 (2009).
66. Ullman-Cullere, M.H., Foltz, C.J. Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. Lab Anim Sci. 49, 319-323 (1999).
67. Napp LC et al. Extrinsic Notch Ligand Delta-Like 1 Regulates Tip Cell Selection and Vascular Branching Morphogenesis. Circ Res. 110, 530-535 (2012).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.
Medizinische Hochschule Hannover

<120> La familia miARN-212/132 como diana terapéutica

<130> 51493P WO

<160> 47

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 22
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> miR-132

<400> 1
uaacagucua cagccauggu cg 22

<210> 2
<211> 21
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> miR-212

<400> 2
uaacagucuc cagucacggc c 21

<210> 3
<211> 22
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> miR-132

<400> 3
uaacagucua cagccauggu cg 22

<210> 4
<211> 22
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> miR-212

<400> 4
uaacagucuc cagucacggc ca 22

<210> 5

<211> 110
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(110)
<223> Bucle-tallo de miR-212 de Homo sapiens

<400> 5

cggggcaccc cgcccggaca gcgcgccggc accuuggcuc uagacugcuu acugcccggg 60

ccgcccucag uaacagucuc cagucacggc caccgacgcc uggccccgcc 110

<210> 6
<211> 101
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(101)
<223> *Bucle-tallo de miR-132 de Homo sapiens*

<400> 6

ccgccccccgc gucuccaggg caaccguggc uuucgauugu uacuguggga acuggaggua 60

acagucuaca gccauggucg ccccgcagca cgcccacgcg c 101

<210> 7
<211> 66
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(66)
<223> Bucle-tallo de miR-132 de *mus musculus*

<400> 7

gggcaaccgu ggcuuucgau uguuacugug ggaaccggag guaacagucu acagccaugg 60

ucgccc 66

<210> 8
<211> 91
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(91)
<223> Bucle-tallo de miR-212 de *mus musculus*

<400> 8

gggcagcgcg ccggcaccuu ggcucuagac ugcuuacugc ccgggccgcc uucaguaaca 60

gucuccaguc acggccaccg acgccuggcc c 91

<210> 9
<211> 22
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> antagomir contra miR-132

<220>
<221> misc_feature
<222> (22)..(22)
<223> n = A-chol (chol = colesterol)

<400> 9
cgaccauggc uguagacugu un 22

<210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo anp de ratón
<400> 10
cctgtgtaca gtgcggtgtc 20

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso anp de ratón
<400> 11
cctagaagca ctgccgtctc 20

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo bnp de ratón
<400> 12
ctgaaggtgc tgtcccagat 20

<210> 13
<211> 20
<212> ADN

<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso bnp de ratón
<400> 13
gttcttttgt gaggccttgg 20

<210> 14
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo alfa-MHC de ratón

<400> 14
ggtccacatt cttcaggatt ctc 23

<210> 15
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso alfa-MHC de ratón

<400> 15
gcgttccttc tctgactttc g 21

<210> 16
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo beta-MHC de ratón

<400> 16
tctcctgctg tttccttact tgct 4

<210> 17
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso beta-MHC de ratón

<400> 17
caggcctgta gaagagctgt actc 24

<210> 18
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo gapdh de ratón

<400> 18
ttcaccacca tggagaaggc 20

<210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso gapdh de ratón

<400> 19
ggcatggact gtggtcatga 20

<210> 20
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo foxo3 de ratón

<400> 20
caaagctggg taccaggctg 20

<210> 21
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso foxo3 de ratón

<400> 21
ttccacgggt aagggcttca 20

<210> 22
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo foxo3 de rata

<400> 22
gatggtgcgc tgtgtgccct ac 22

<210> 23
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso foxo3 de rata

<400> 23
ccaagagctc ttgccagtcc ctt 23

<210> 24
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo de la región promotora lc3 (ChIP) de rata

<400> 24
ggctggactt gaattcagaa a 21

<210> 25
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso de la región promotora lc3 (ChIP) de rata

<400> 25
acttgctgtt ccaggtggtc 20

<210> 26
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo atrogin1 de ratón

<400> 26
gcaaacactg ccacattctc tc 22

<210> 27
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso atrogin1 de ratón

<400> 27
cttgagggga aagtgagacg 20

<210> 28
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo atrogin1 de rata

<400> 28
ccatcaggag aagtggatct atgtt 25

<210> 29
<211> 26
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso atrogin1 de rata

<400> 29
gttcatgaag ttcttttggg cgatgc 26

<210> 30
<211> 17
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador direscto mcip1 de ratón

<400> 30
ctgcacaaga ccgagtt 17

<210> 31
<211> 16
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso mcip1 de ratón

<400> 31
tgtttgtcgg gattgg 16

<210> 32
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo mcipl de rata

<400> 32
agctccctga ttgcctgtgt 20

<210> 33
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso mcipl de rata
<400> 33
tttggccctg gtctcacttt 20

<210> 34
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo lc3b de ratón

<400> 34
cgtcctggac aagaccaagt 20

<210> 35
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso lc3b de ratón

<400> 35
attgctgtcc cgaatgtctc 20

<210> 36
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo ulk2 de ratón

<400> 36
cagccctgga tgagatgttt 20

<210> 37
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> cebador inverso ulk2 de ratón

<400> 37
ggatgggtga cagaaccaag 20

<210> 38
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo atg12 de ratón

<400> 38
ggcctcggaa cagttgttta 20

<210> 39
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso atg12 de ratón

<400> 39
cagcaccgaa atgtctctga 20

<210> 40
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo beclin1 de ratón

<400> 40
ggccaataag atgggtctga 20

<210> 41
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso beclin1 de ratón

<400> 41
cactgcctcc agtgtcttca 20

<210> 42
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo plk3c3 de ratón

<400> 42
tgtcagatga ggaggctgtg 20

<210> 43
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>

<223> cebador inverso plk3c3 de ratón

<400> 43
ccaggcacga cgtaacttct 20

<210> 44
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo bnip3 de ratón

<400> 44
gaactgcact tcagcaatgg 20

<210> 45
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso bnip3 de ratón

<400> 45
atttcagctc tgttggtatc 20

<210> 46
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador directo atg5 de ratón

<400> 46
gacaaagatg tgcttcgaga tgtg 24

<210> 47
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador inverso atg5 de ratón

<400> 47
ataatgccat ttcaggggtg tgc 23

**REIVINDICACIONES**

1. Un inhibidor de miR-132 para su uso en el tratamiento o prevención de hipertrofia cardíaca, trastornos autofágicos o asociados a hipertrofia cardíaca, y/o disfunción cardíaca, en el que el inhibidor es una molécula de ácido nucleico aislada que tienen suficiente complementariedad con miR-132 para formar un híbrido en condiciones fisiológicas.

2. El inhibidor para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que es una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla y doble cadena, particularmente un antagomir.

3. El inhibidor para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la disfunción cardíaca se selecciona de entre disfunción contráctil, descompensación cardíaca o insuficiencia cardíaca, prevención de remodelado cardíaco después del infarto de miocardio, miocarditis, enfermedades valvulares cardíacas, trastornos cardíacos genéticos con hipertrofia cardíaca, por ejemplo, cardiomiopatía hipertrófica no obstructiva y obstructiva, enfermedad de Fabry.

4. El inhibidor para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, donde el trastorno autofágico cardíaco se selecciona de entre trastornos cardíacos que incluyen degeneración muscular esquelética y cardíaca.

5. El inhibidor para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para la administración a pacientes que se seleccionan de entre:

(i) pacientes que tienen un riesgo aumentado de insuficiencia cardíaca,
(ii) pacientes que sufren insuficiencia cardíaca (congestiva),
(iii) pacientes después de un infarto de miocardio,
(iv) pacientes con enfermedades cardíacas congénitas asociadas con hipertrofia cardíaca, tal como estenosis de la vena pulmonar, defectos del septo auricular o ventricular.

6. El inhibidor para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 en combinación con un medicamento adicional, particularmente donde el medicamento adicional se selecciona de entre agentes moduladores de angiotensina, β-bloqueantes, diuréticos, antagonistas de aldosterona, vasodilatadores, agentes inotrópicos o combinaciones de los mismos.

7. Una molécula de ácido nucleico, particularmente una molécula de cadena sencilla o doble cadena, que comprende

(a) una secuencia de nucleótidos que es la complementaria de una secuencia de nucleótidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1 o un precursor de la SEQ ID NO: 1, y/o
(b) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos un 80 %, al menos un 90 %, o particularmente al menos un 95 % con una secuencia de (a),

para su uso en el tratamiento o prevención de trastornos cardíacos, que implica trastornos autofágicos cardíacos y/o hipertrofia cardíaca.

8. Una molécula de ácido nucleico aislada, particularmente una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla o doble cadena, que comprende

(a) una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 o un precursor de SEQ ID NO: 1, y/o
(b) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos un 80 %, al menos un 90 %, o particularmente al menos un 95 % con una secuencia de (a),

para su uso en el tratamiento o prevención de trastornos cardíacos que implican trastornos autofágicos y/o atrofia cardíaca.

9. Uso de una molécula de ácido nucleico aislada, particularmente una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla o doble cadena, que comprende

(a) una secuencia de nucleótidos como se muestra en SEQ ID NO: 1 o un precursor de SEQ ID NO: 1,
(b) una secuencia de nucleótidos que es la complementaria de (a), y/o
(c) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad de al menos un 80 %, al menos un 90 %, o particularmente al menos un 95 % con una secuencia de (a),

en el diagnóstico *in vitro* de trastornos cardíacos que implican trastornos autofágicos cardíacos y/o hipertrofia cardíaca.

10. La molécula de ácido nucleico aislada para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 7-8 o el uso de la molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 9, que es una molécula de miARN o un análogo

de la misma que tiene una longitud de desde 18-25 nucleótidos, particularmente 21 o 22 nucleótidos; o una molécula precursora de miARN que tiene una longitud de 50-120 nucleótidos o una molécula de ADN que codifica el mismo.

11. El inhibidor de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, la molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-8 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-8 o 10 o el uso de la molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10, que es una molécula de ARN que comprende opcionalmente al menos un componente básico modificado, donde el componente básico modificado se selecciona particularmente de los componentes básicos con bases nucleicas modificadas, componentes básicos con un azúcar modificado, componentes básicos con la estructura modificada y combinaciones de los mismos.

12. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 8 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 10-11 donde el tratamiento o prevención es el tratamiento o prevención de trastornos cardíacos que implican atrofia cardíaca y/o trastornos autofágicos cardíacos de autofagia exagerada y/o caquexia cardíaca.

13. El uso de la molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9-11 en el diagnóstico de trastornos que implican trastornos autofágicos, particularmente en el diagnóstico de caquexia cardíaca.

14. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-8 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-8 o 10-12 para la administración a pacientes seleccionados de entre:

(i) pacientes que tienen un aumento del riesgo de o que padecen trastornos autofágicos,
(ii) pacientes que tienen un aumento del riesgo o padecen caquexia cardíaca
(iii) pacientes que tienen un aumento del riesgo o padecen atrofia cardíaca.

15. La molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-8 para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-8, 10-12 o 14 en combinación con un medicamento adicional.

Figura 1

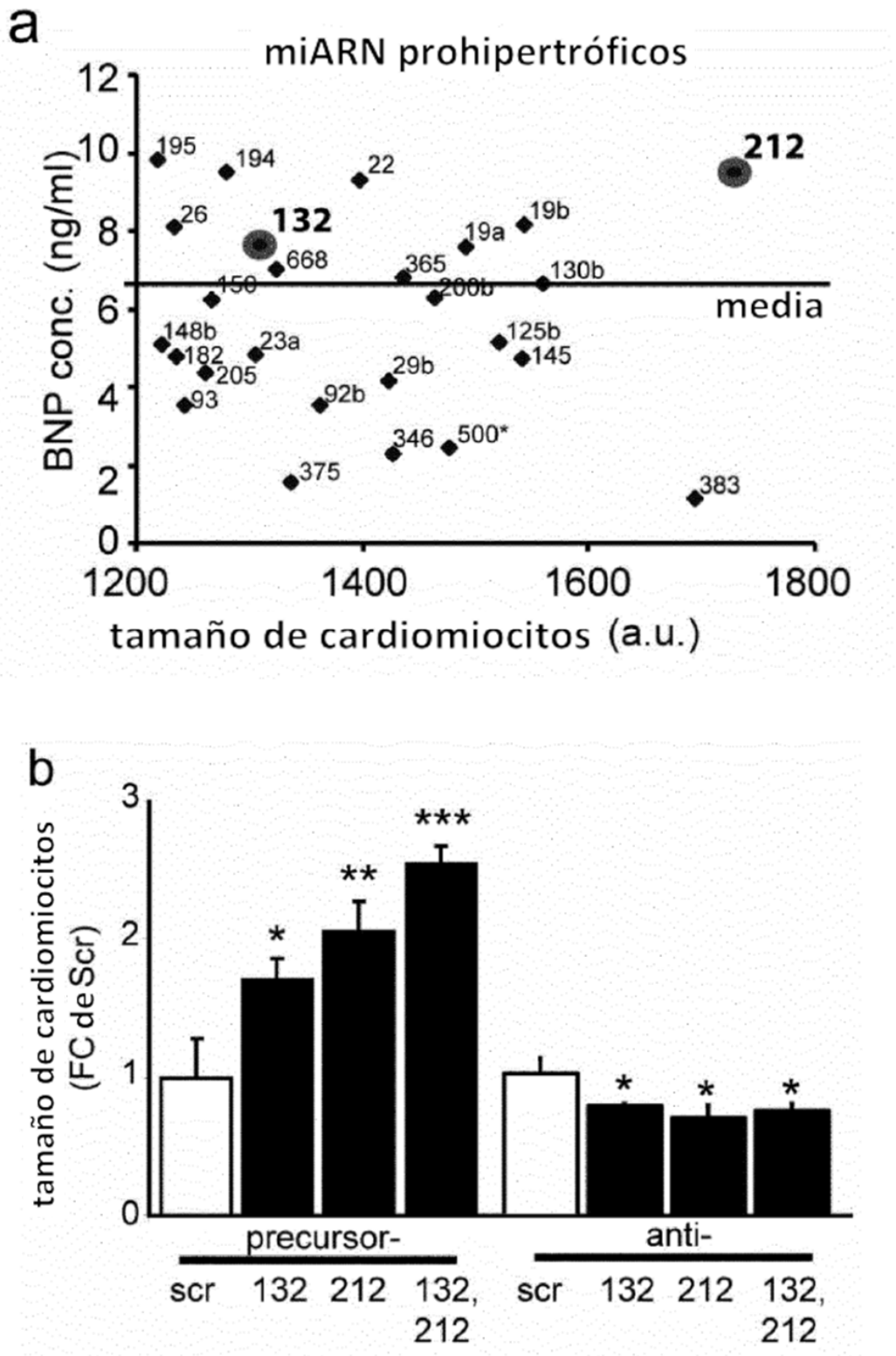

a
miARN prohipertróficos
BNP conc. (ng/ml)
tamaño de cardiomiocitos (a.u.)
media
195
194
22
212
26
132
19a
19b
668
365
130b
150
200b
148b
23a
125b
182
145
205
29b
92b
93
346
500*
375
383
b
tamaño de cardiomiocitos (FC de Scr)
precursor-
anti-
scr
132
212
132, 212

**Figura** 1 continuación

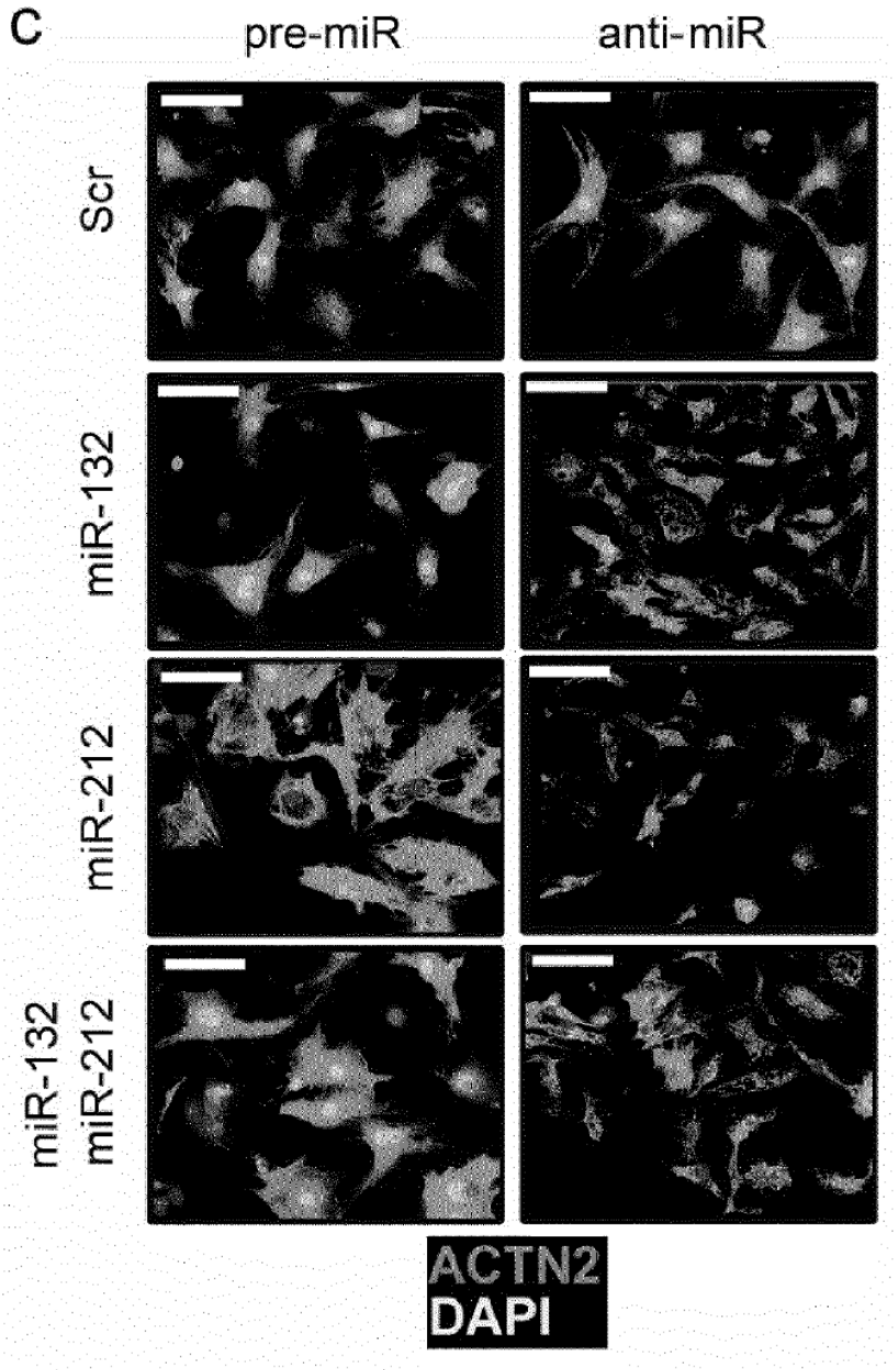
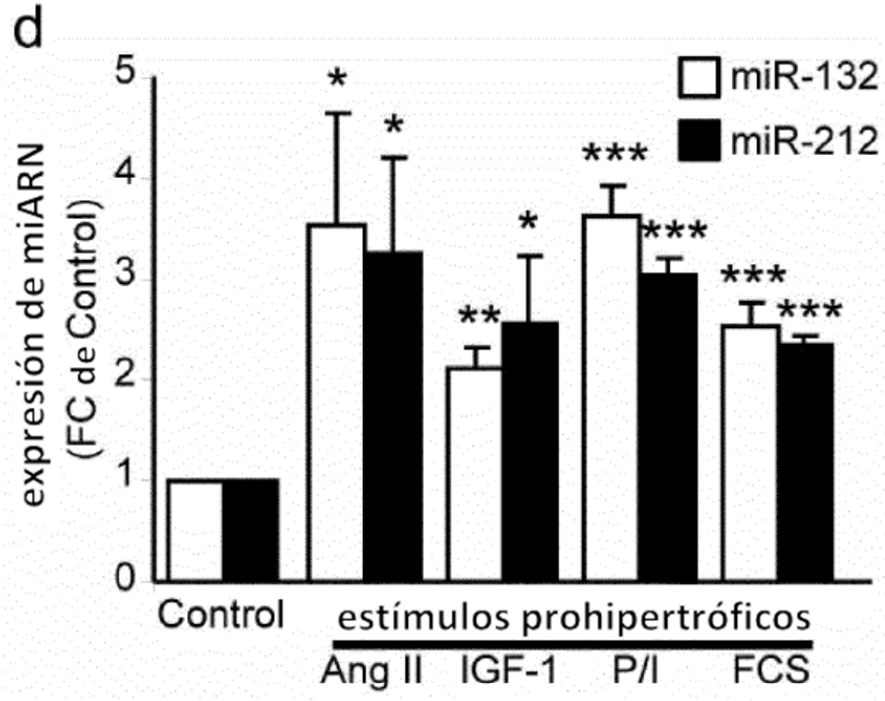
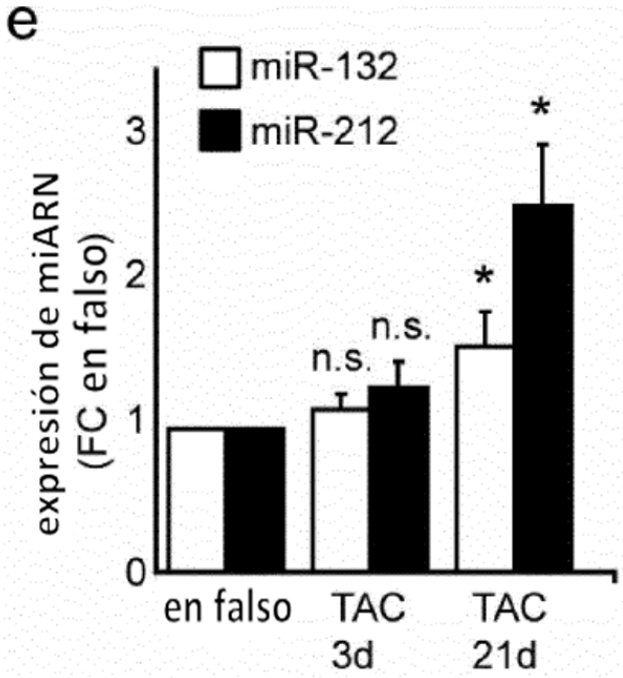


**Figura** 1 continuación



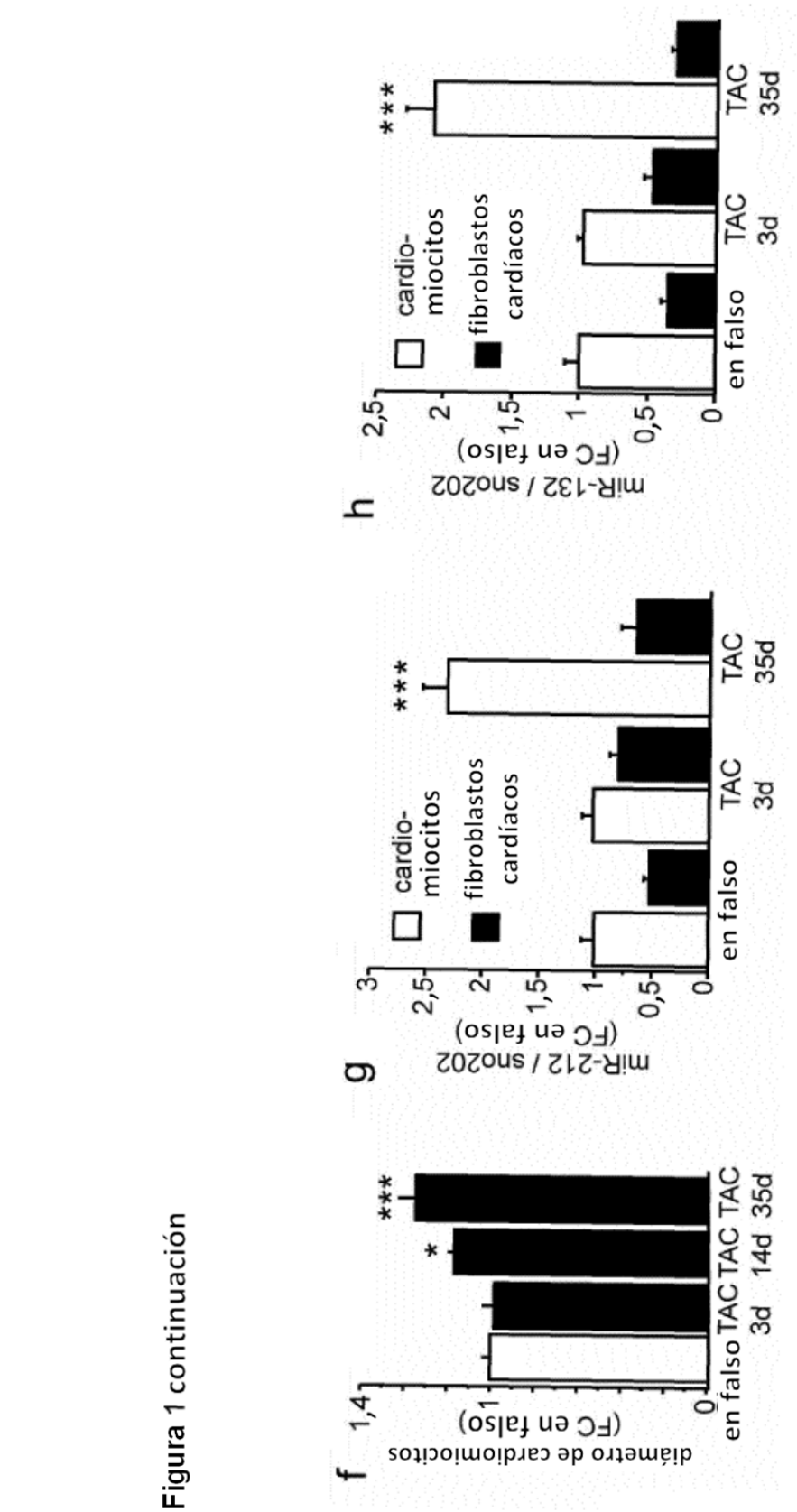



**Figura 1 continuación**

Figura 2

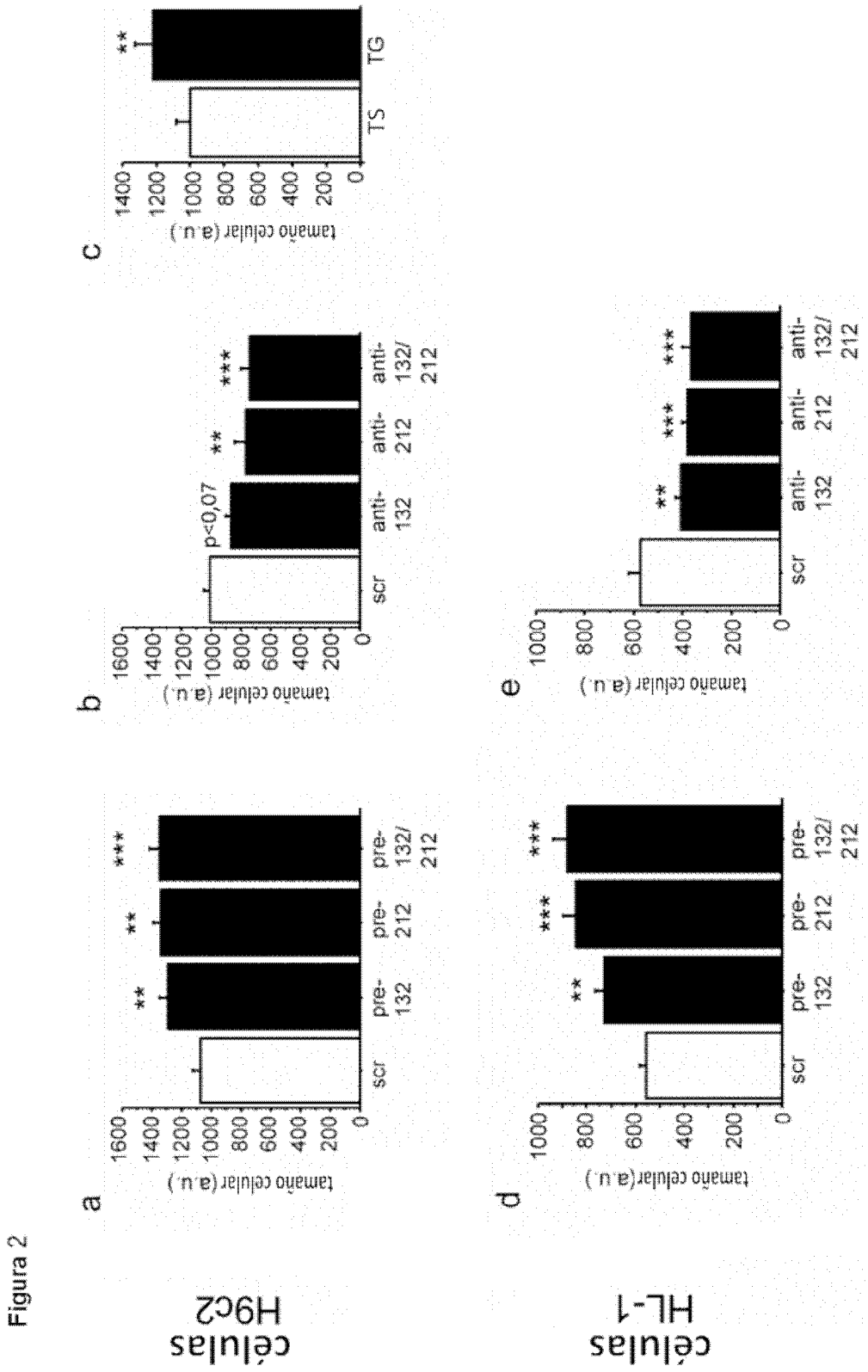

células H9c2
células HL-1
a
b
c
d
e
tamaño celular (a.u.)
scr
pre-132
pre-212
pre-132/212
anti-132
anti-212
anti-132/212
p<0,07
TS
TG
**
***

**Figura** 3

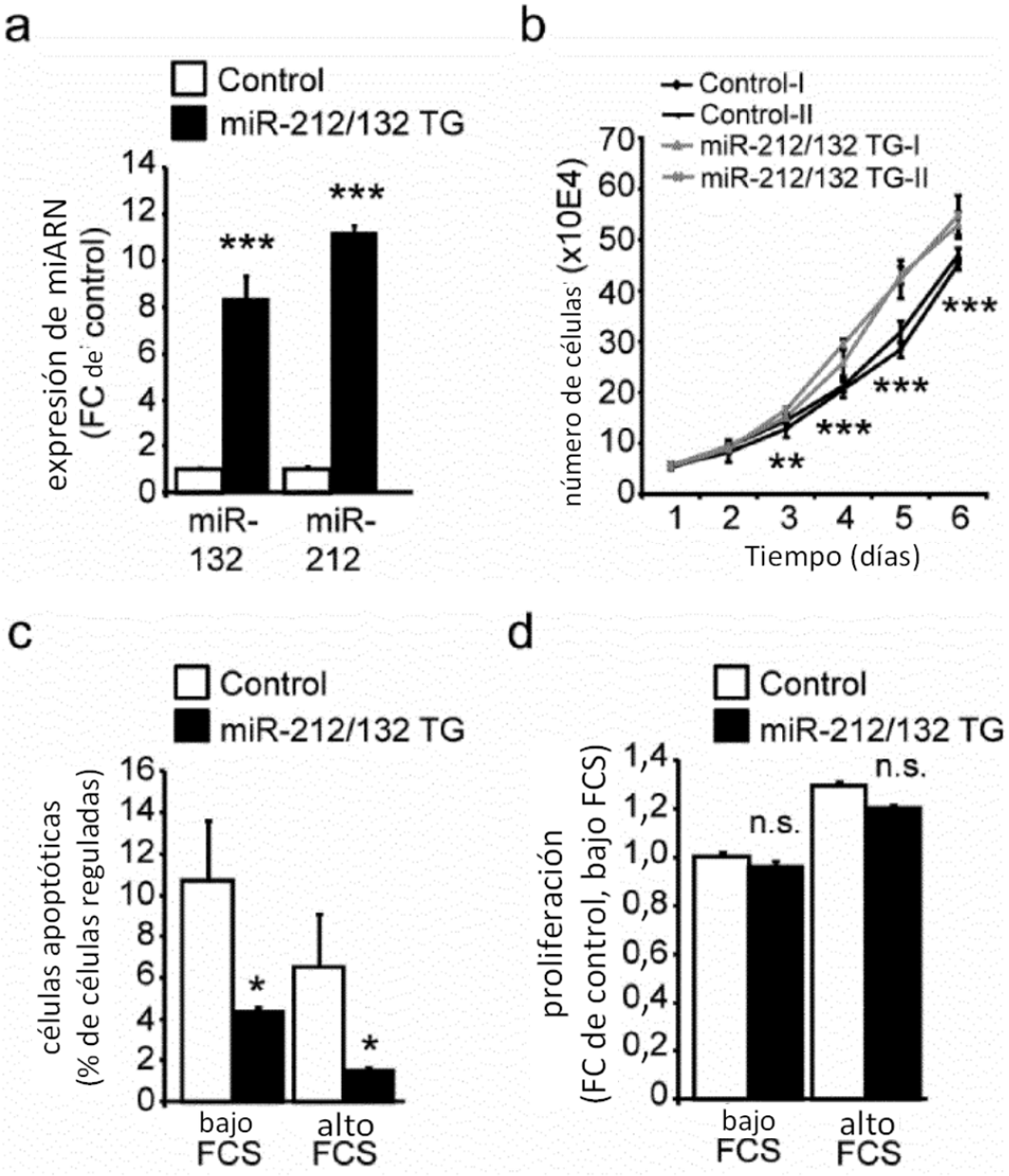

a
Control
miR-212/132 TG
expresión de miARN (FC de control)
14
12
10
8
6
4
2
0
***
***
miR-132
miR-212
b
Control-I
Control-II
miR-212/132 TG-I
miR-212/132 TG-II
número de células (x10E4)
70
60
50
40
30
20
10
0
**
***
***
***
1
2
3
4
5
6
Tiempo (días)
c
Control
miR-212/132 TG
células apoptóticas (% de células reguladas)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
*
*
bajo FCS
alto FCS
d
Control
miR-212/132 TG
proliferación (FC de control, bajo FCS)
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0
n.s.
n.s.
bajo FCS
alto FCS

**Figura 4**

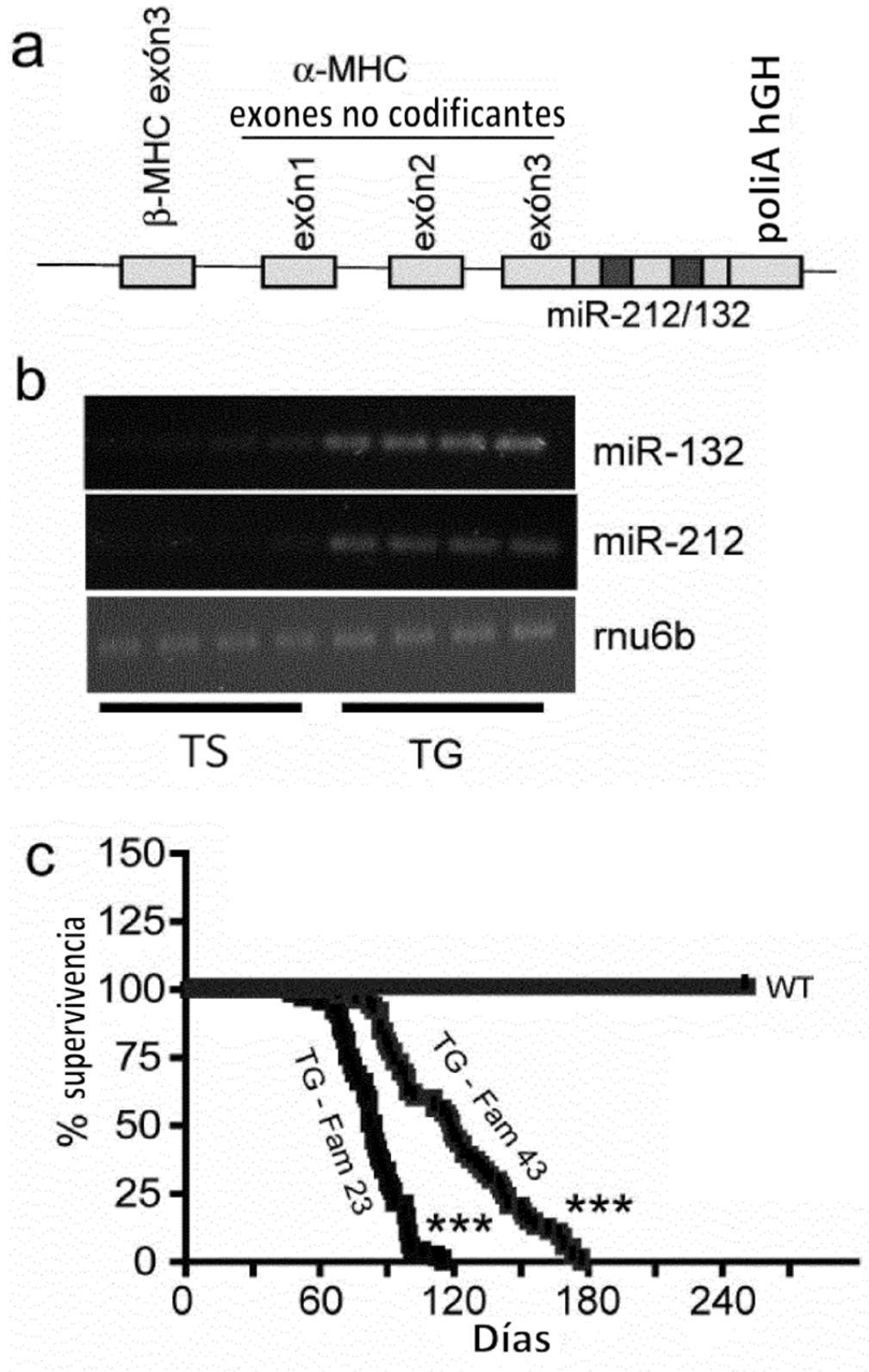

a
β-MHC exón3
α-MHC
exones no codificantes
exón1
exón2
exón3
poliA hGH
miR-212/132
b
miR-132
miR-212
rnu6b
TS
TG
c
% supervivencia
150
125
100
75
50
25
0
WT
TG - Fam 23
TG - Fam 43
***
***
0
60
120
180
240
Días

Figura 4 continuación

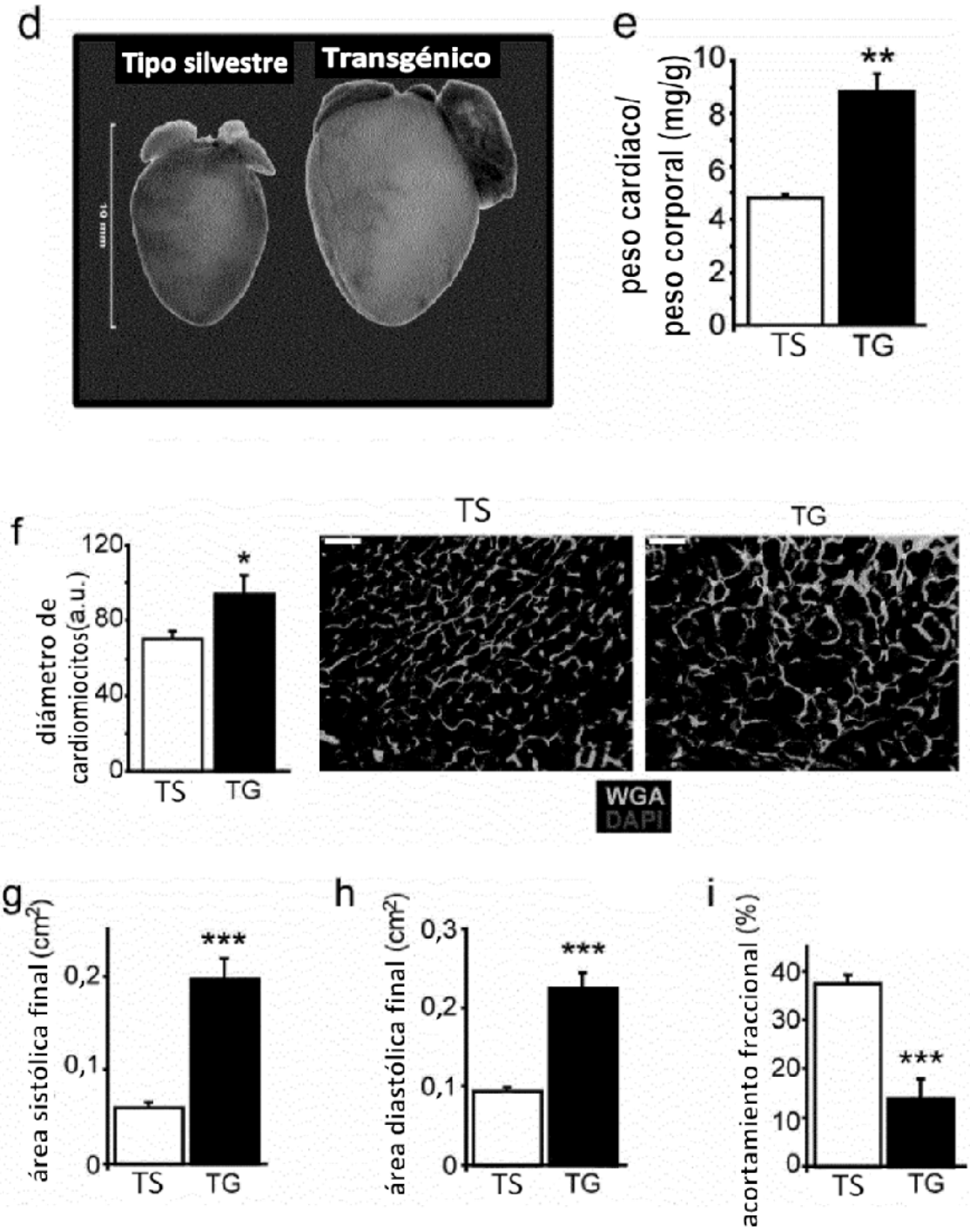


**Figura** 5

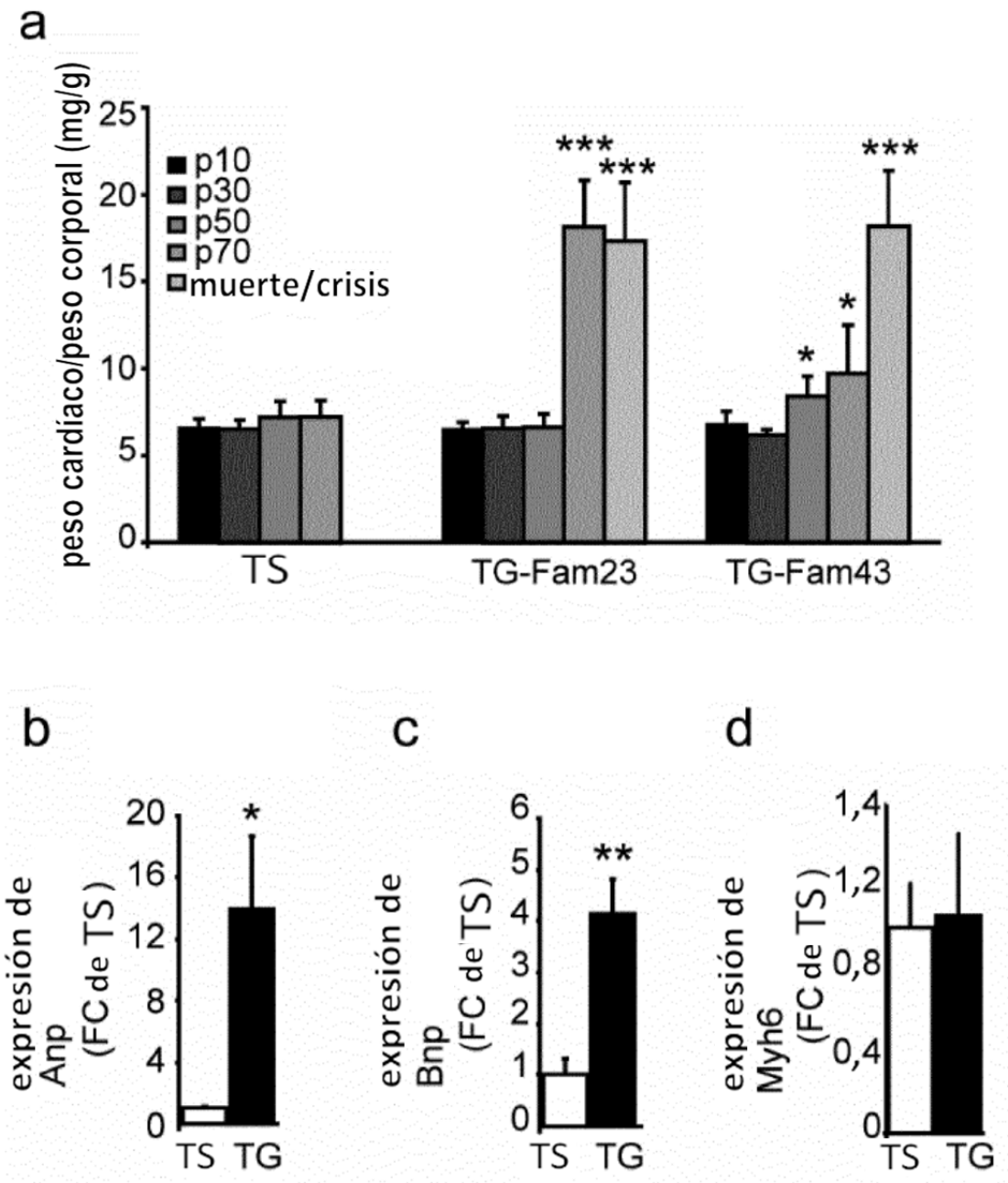
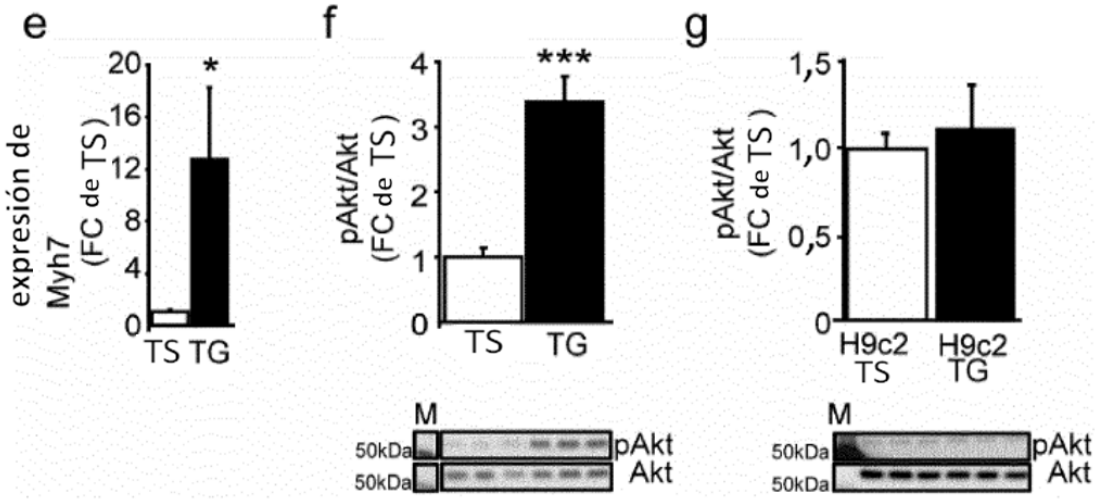
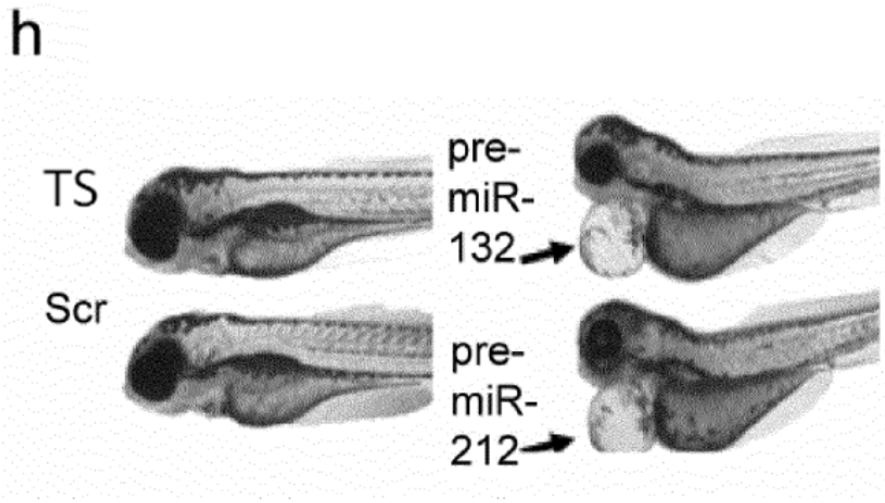

a
peso cardíaco/peso corporal (mg/g)
25
20
15
10
5
0
p10
p30
p50
p70
muerte/crisis
***
***
*
*
***
TS
TG-Fam23
TG-Fam43
b
expresión de Anp (FC de TS)
20
16
12
8
4
0
*
TS
TG
c
expresión de Bnp (FC de TS)
6
5
4
3
2
1
0
**
TS
TG
d
expresión de Myh6 (FC de TS)
1,4
1,2
0,8
0,4
0
TS
TG

**Figura** 5 continuación



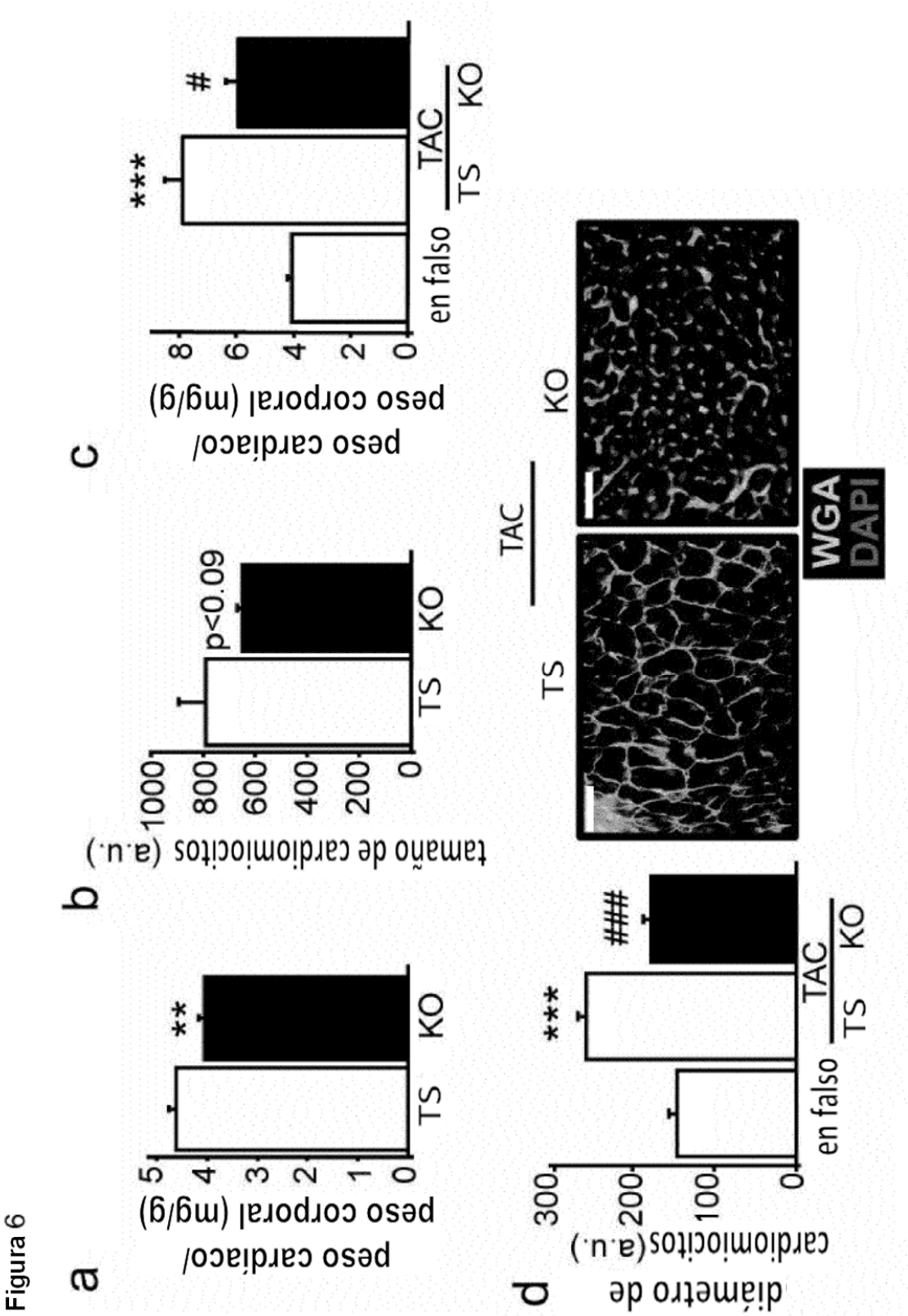

a
peso cardíaco/ peso corporal (mg/g)
0
1
2
3
4
5
**
TS
KO
b
tamaño de cardiomiocitos (a.u.)
0
200
400
600
800
1000
p<0.09
TS
KO
c
peso cardíaco/ peso corporal (mg/g)
0
2
4
6
8
***
#
en falso
TS
TAC
KO
d
diámetro de cardiomiocitos (a.u.)
0
100
200
300
***
###
en falso
TS
TAC
KO
TS
TAC
KO
WGA
DAPI

Figura 6

Figura 6 continuación

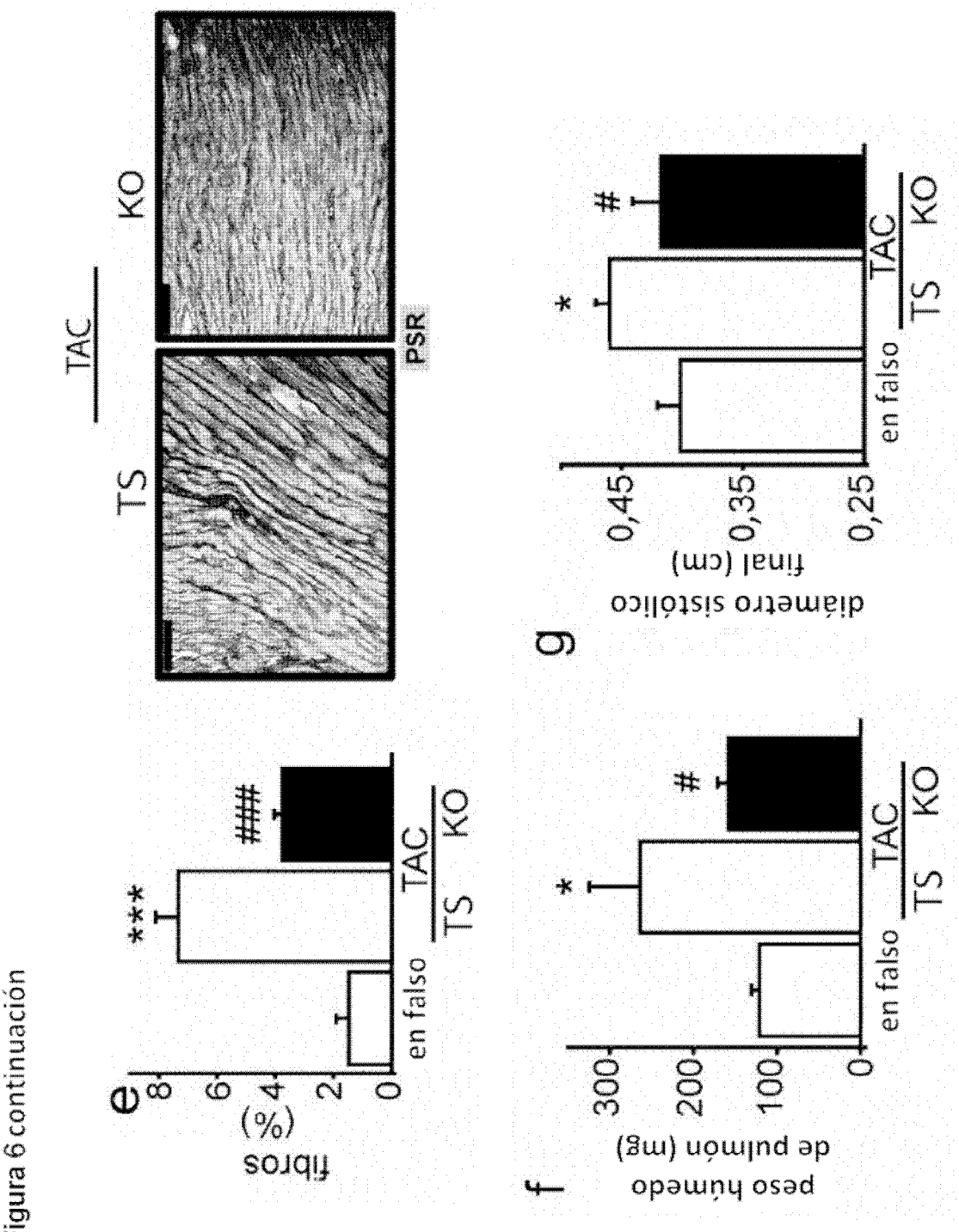
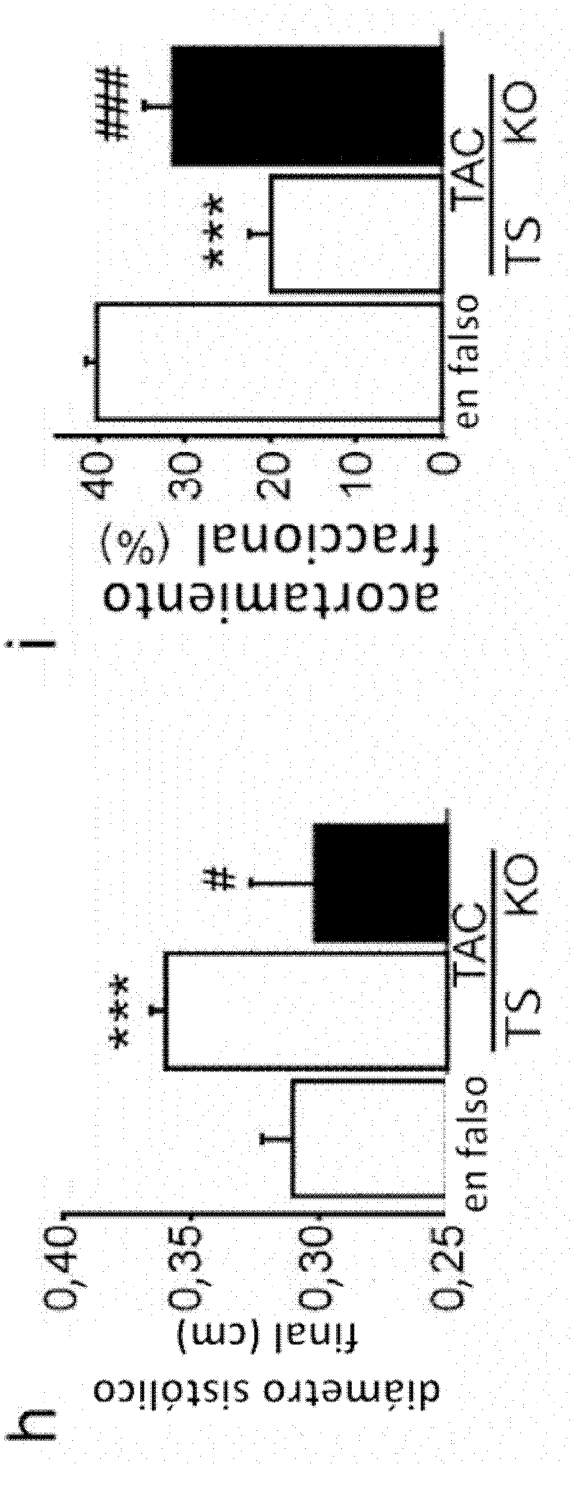


Figura 6 continuación



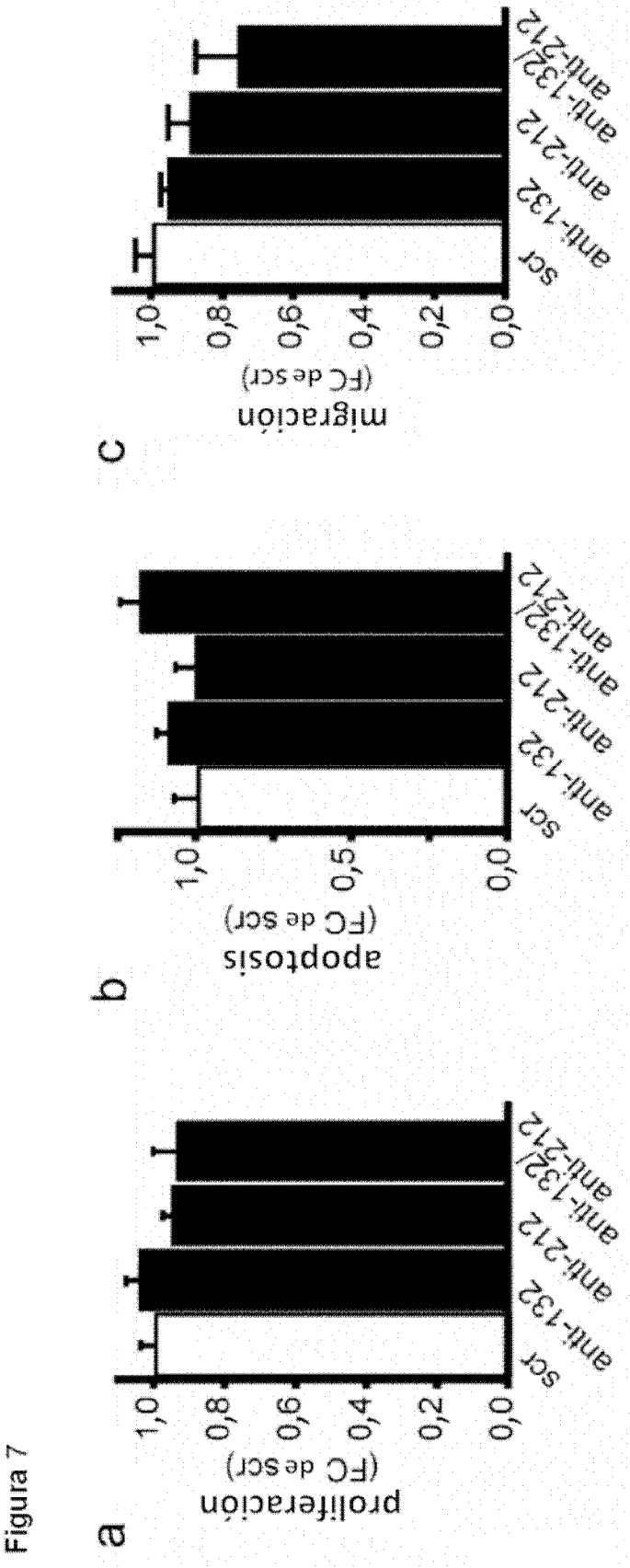

a
proliferación
(FC de scr)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
scr
anti-132
anti-212
anti-132/
anti-212
b
apoptosis
(FC de scr)
1,0
0,5
0,0
scr
anti-132
anti-212
anti-132/
anti-212
c
migración
(FC de scr)
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
scr
anti-132
anti-212
anti-132/
anti-212

Figura 7

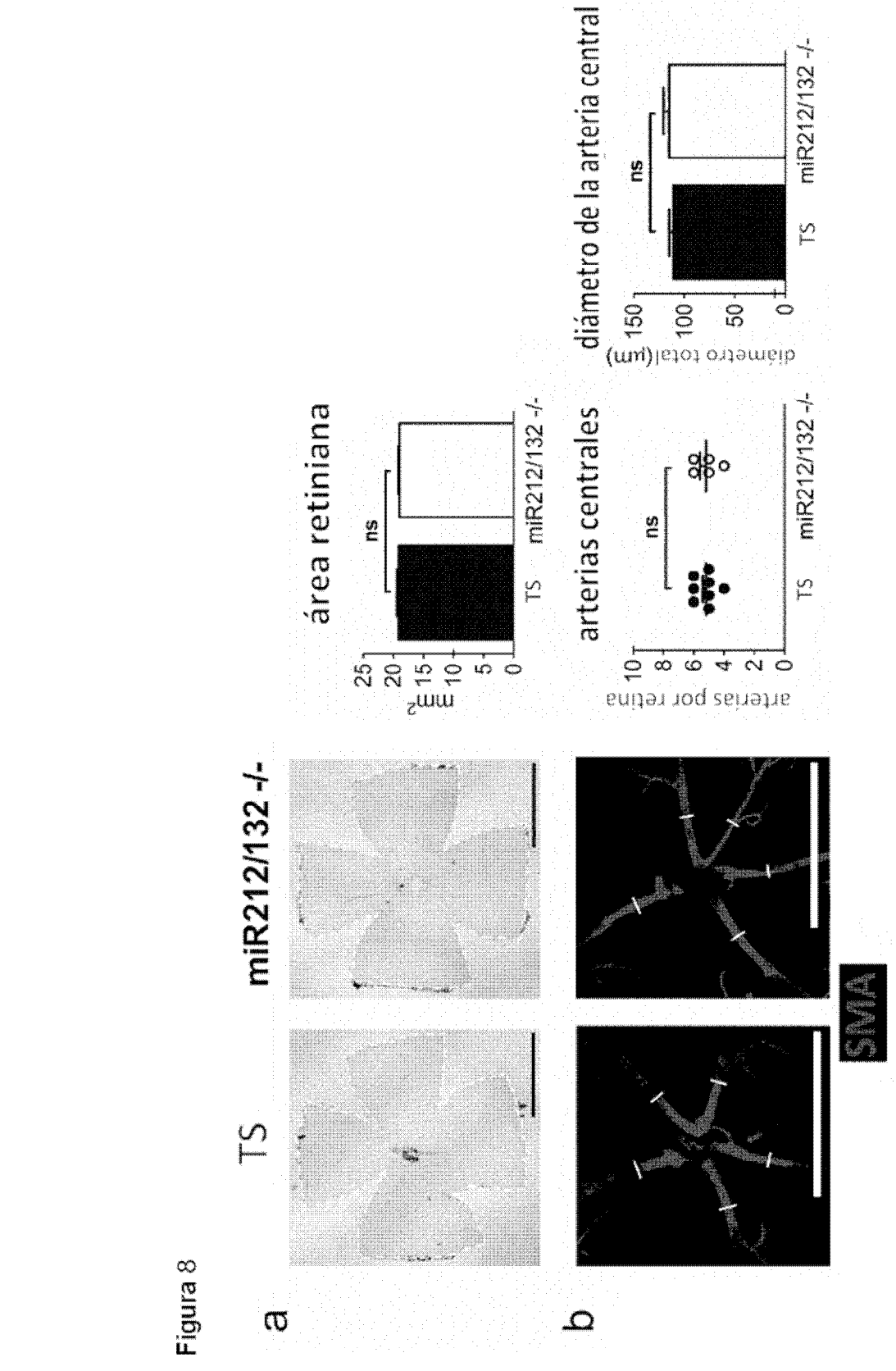

a
TS
miR212/132 -/-
área retiniana
mm²
25
20
15
10
5
0
ns
TS
miR212/132 -/-
b
arterias centrales
arterias por retina
10
8
6
4
2
0
ns
TS
miR212/132 -/-
diámetro de la arteria central
diámetro total(µm)
150
100
50
0
ns
TS
miR212/132 -/-
SMA

Figura 8

Figura 8 continuación

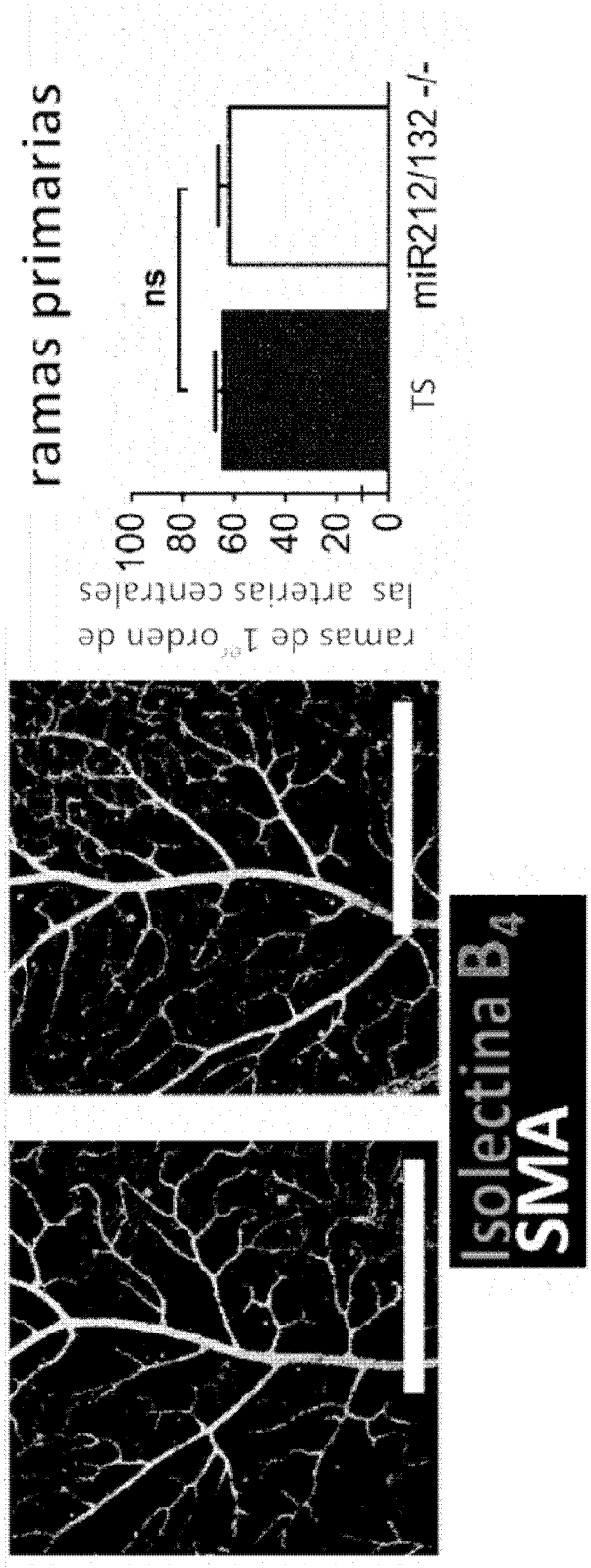


Figura 8 continuación

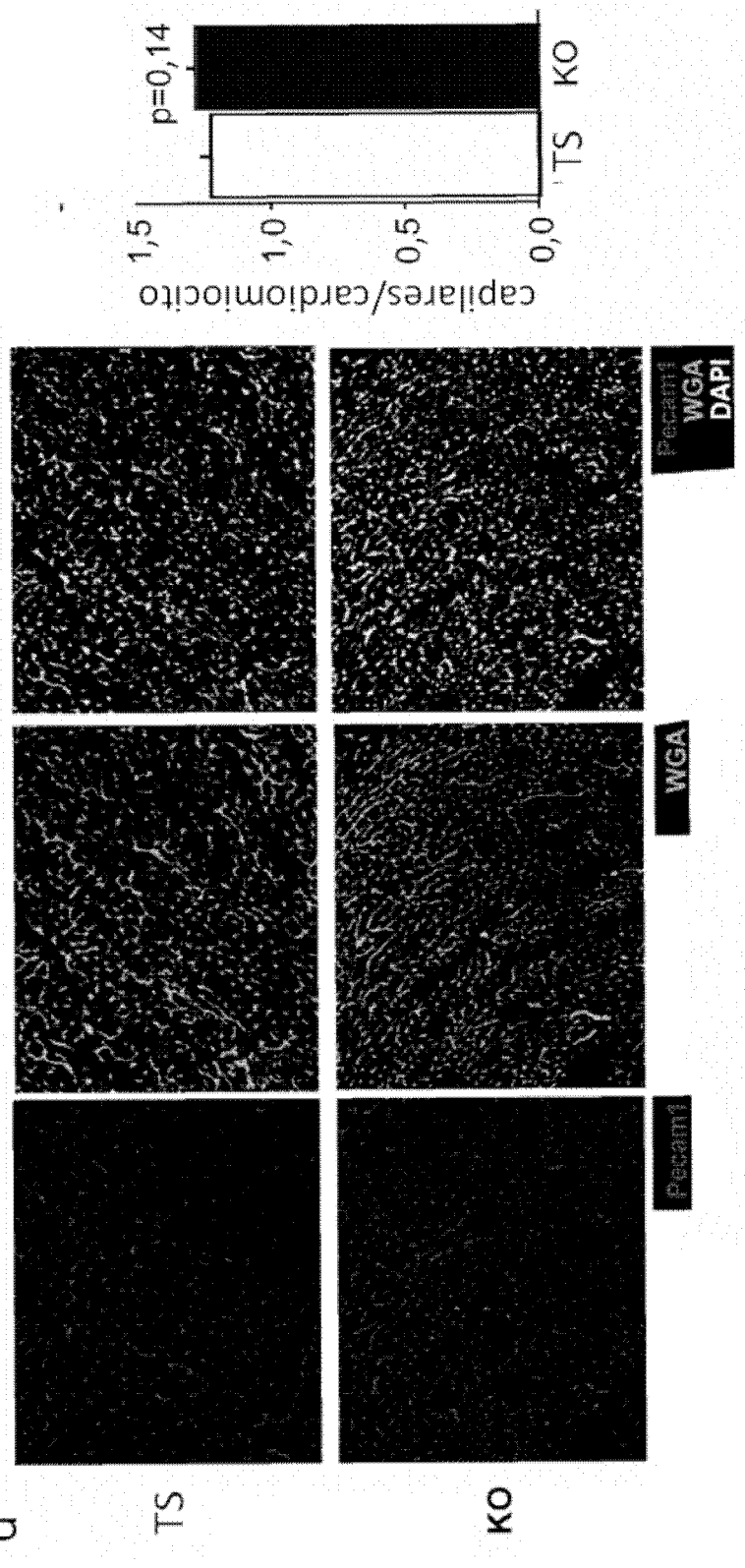


Figura 9

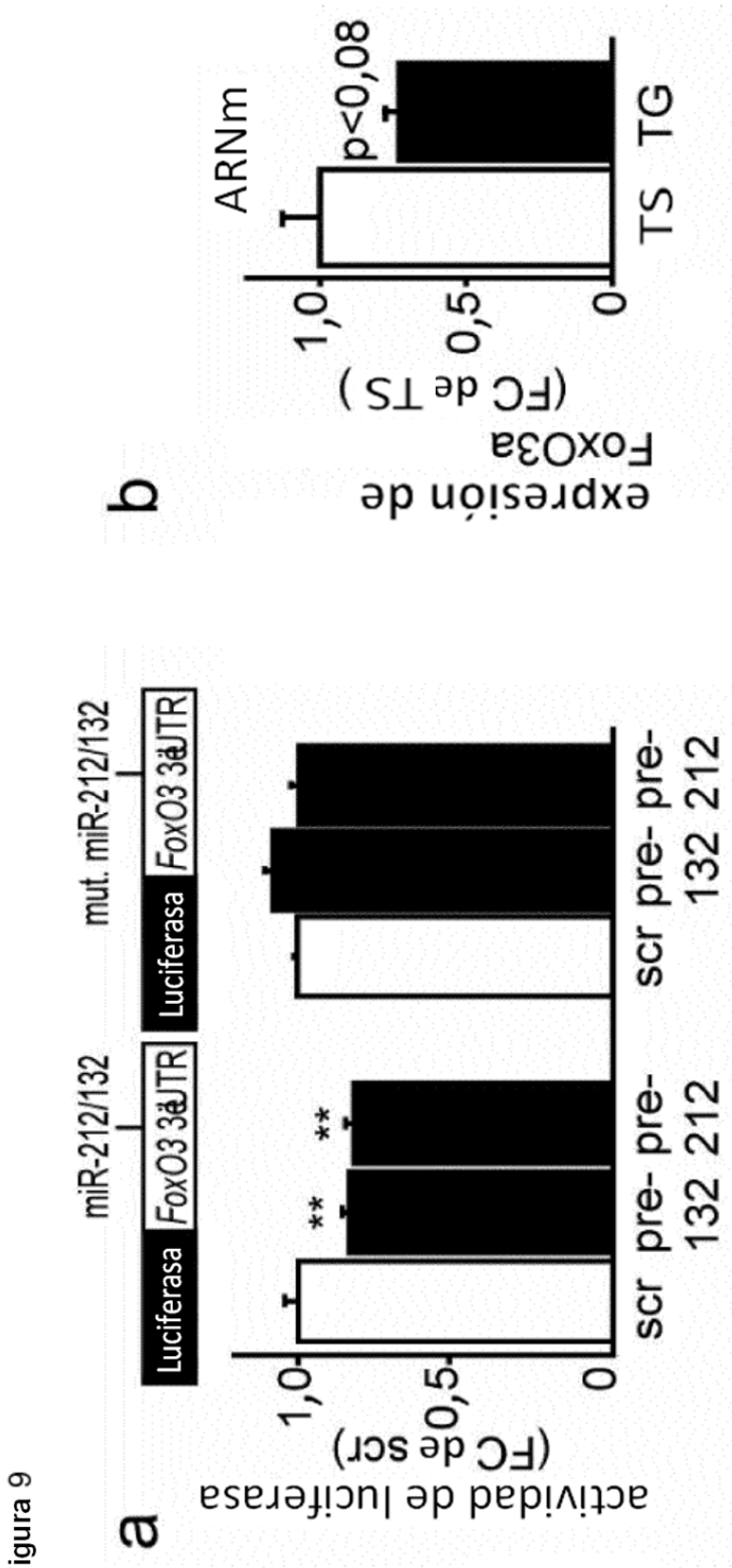
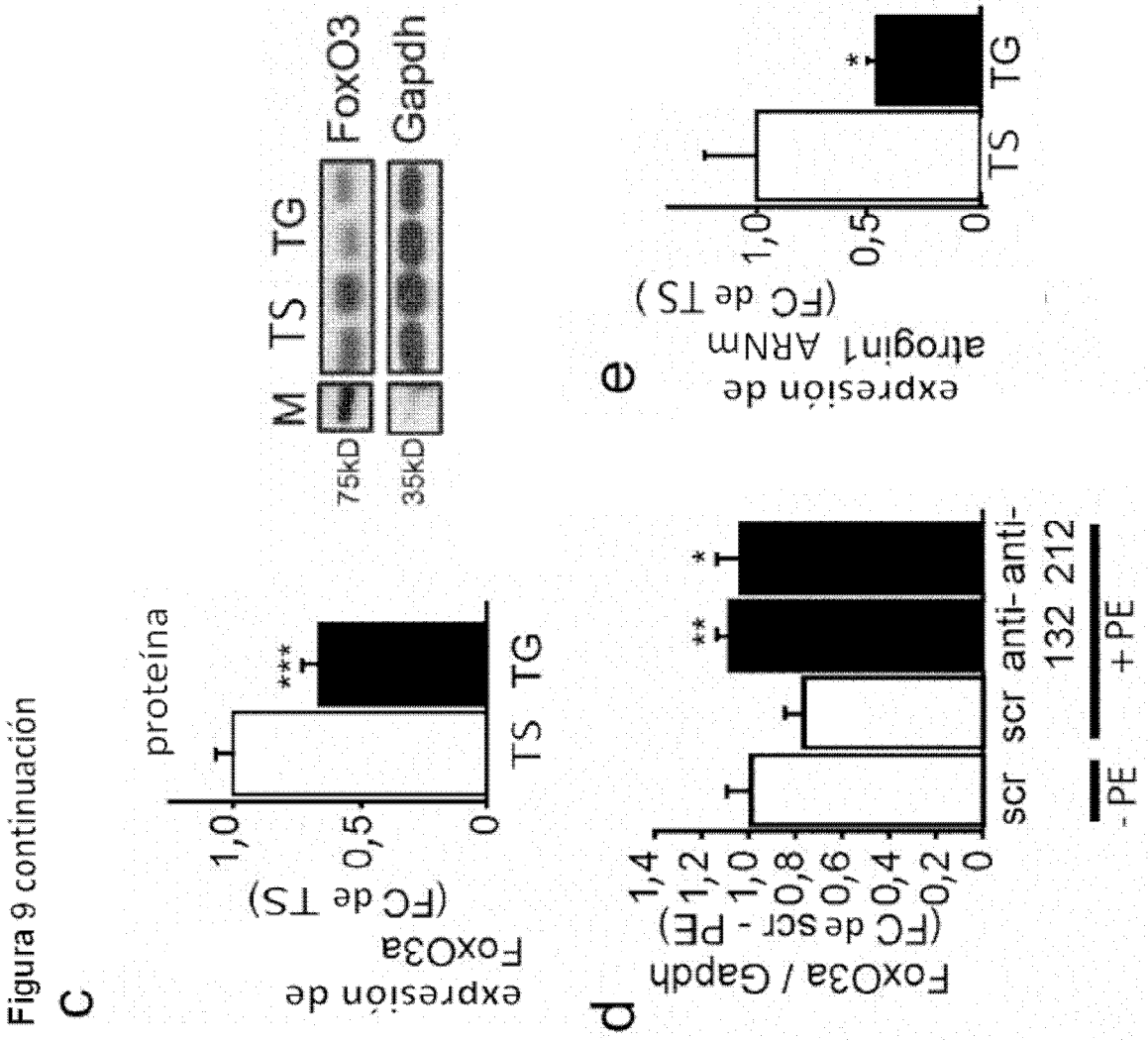

a
actividad de luciferasa
(FC de scr)
1,0
0,5
0
**
**
scr
pre-132
pre-212
miR-212/132
Luciferasa
FoxO3 3'UTR
mut. miR-212/132
Luciferasa
FoxO3 3'UTR
scr
pre-132
pre-212
b
expresión de FoxO3a
(FC de TS)
1,0
0,5
0
p<0,08
ARNm
TS
TG

Figura 9 continuación



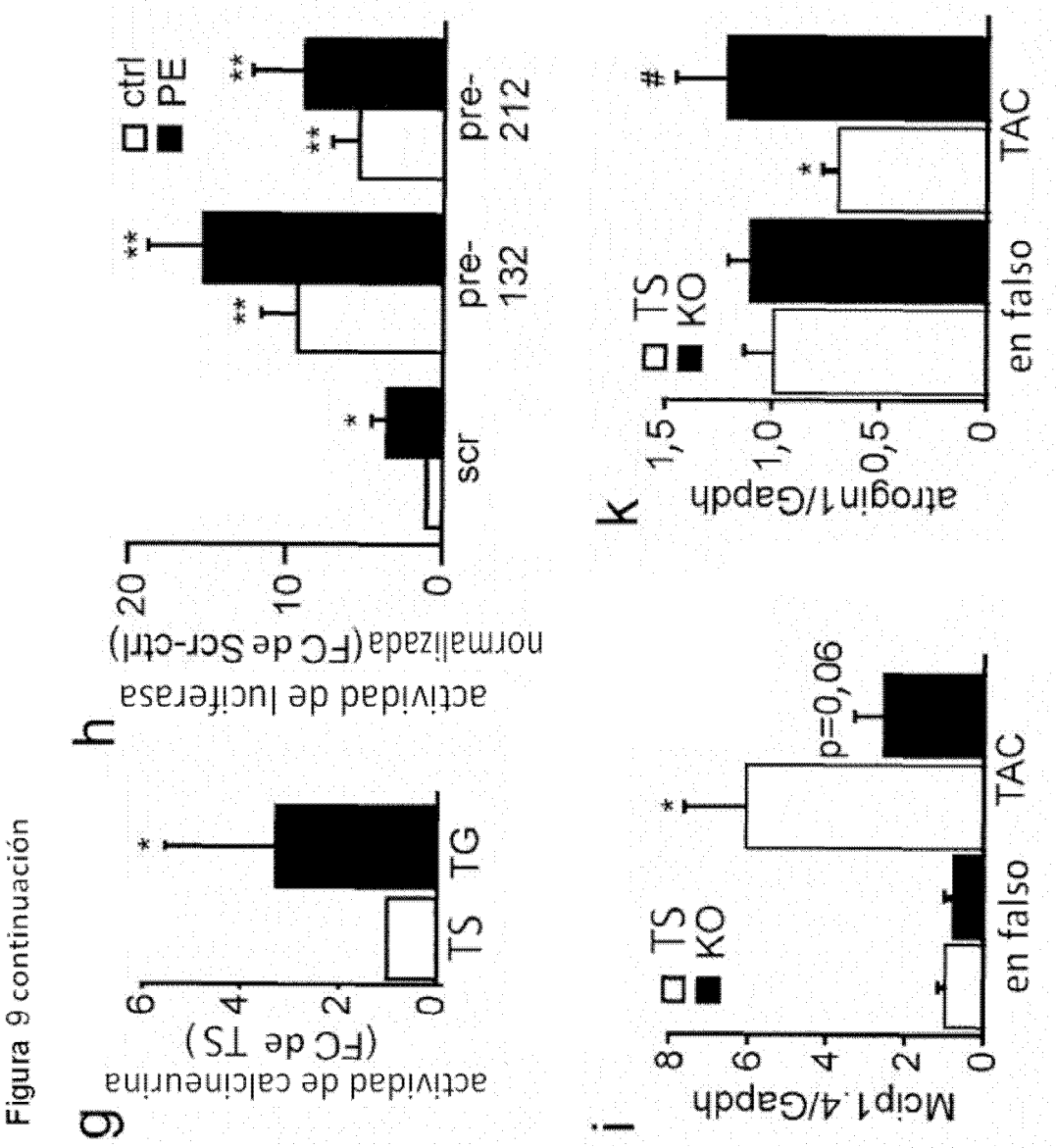



Figura 9 continuación

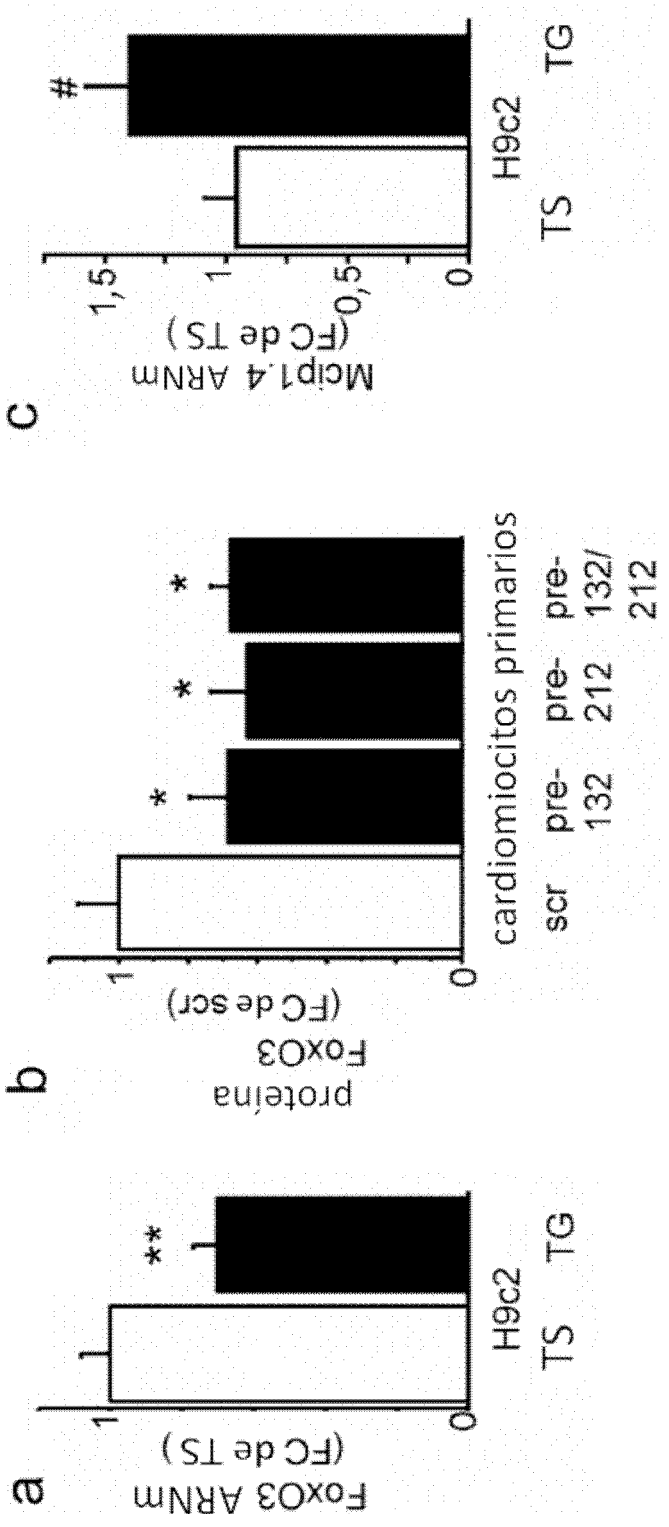

a
FoxO3 ARNm
(FC de TS)
1
0
**
H9c2
TS TG
b
proteína
FoxO3
(FC de scr)
1
0
*
*
*
cardiomiocitos primarios
scr pre-132 pre-212 pre-132/212
c
Mcip1.4 ARNm
(FC de TS)
1,5
1
0,5
0
#
H9c2
TS TG

Figura 10

Figura 11

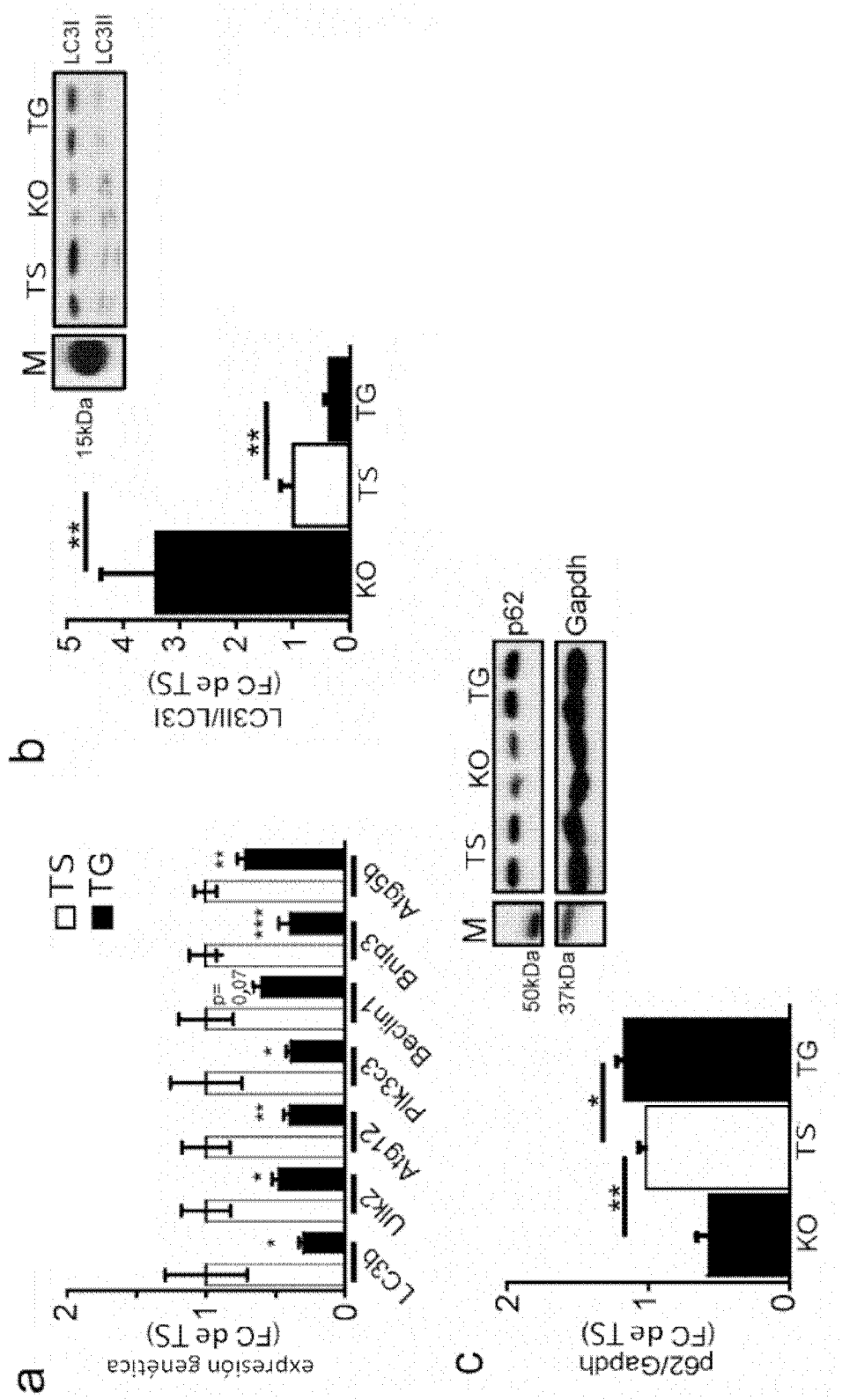
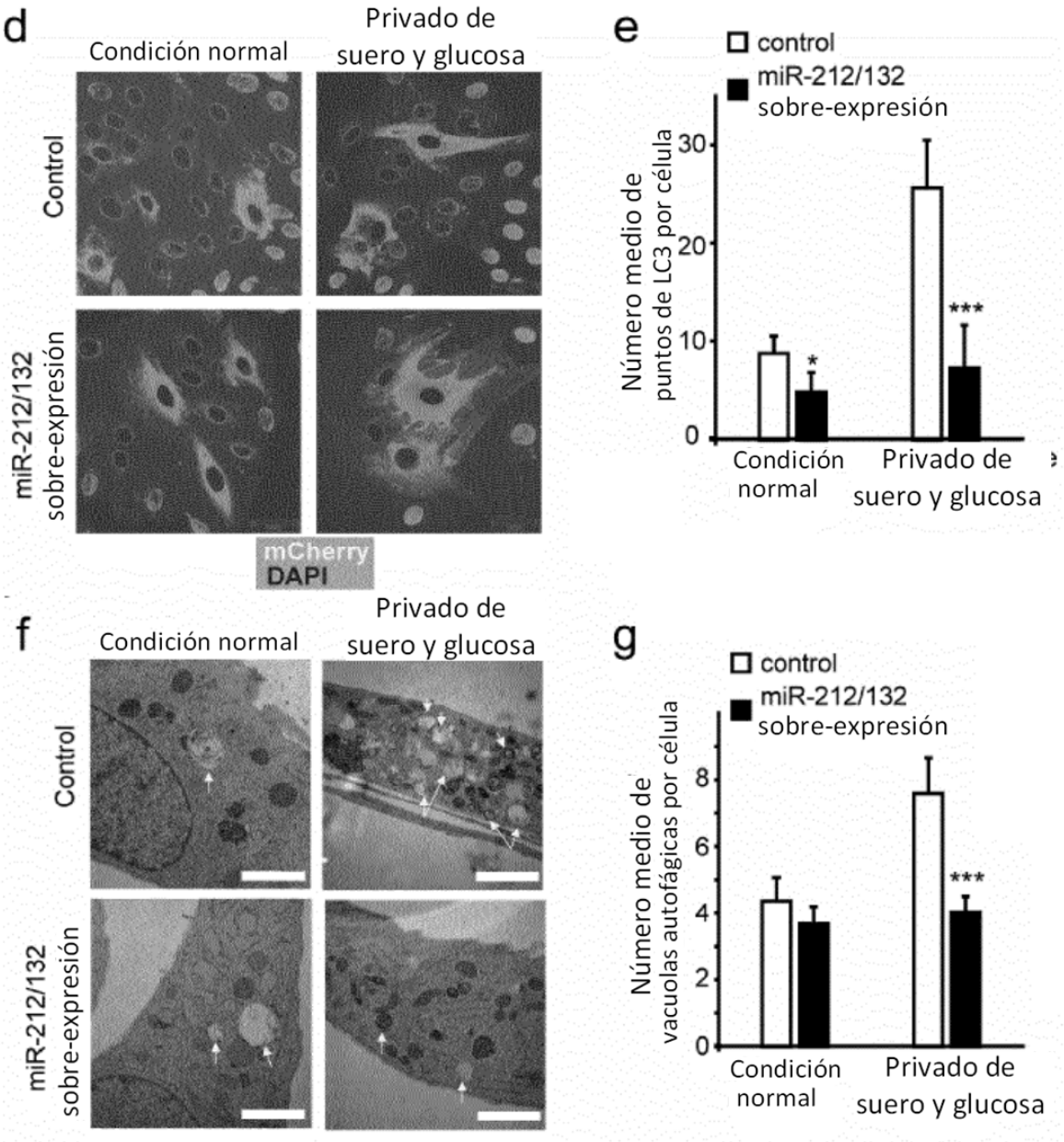

a
expresión genética
(FC de TS)
TS
TG
Lc3b
Ulk2
Atg12
Pik3c3
Becliin1
Bnip3
Atg5b
p=0,07
b
LC3II/LC3I
(FC de TS)
KO
TS
TG
M
15kDa
LC3I
LC3II
c
p62/Gapdh
(FC de TS)
p62
Gapdh
50kDa
37kDa

Figura 11 continuación



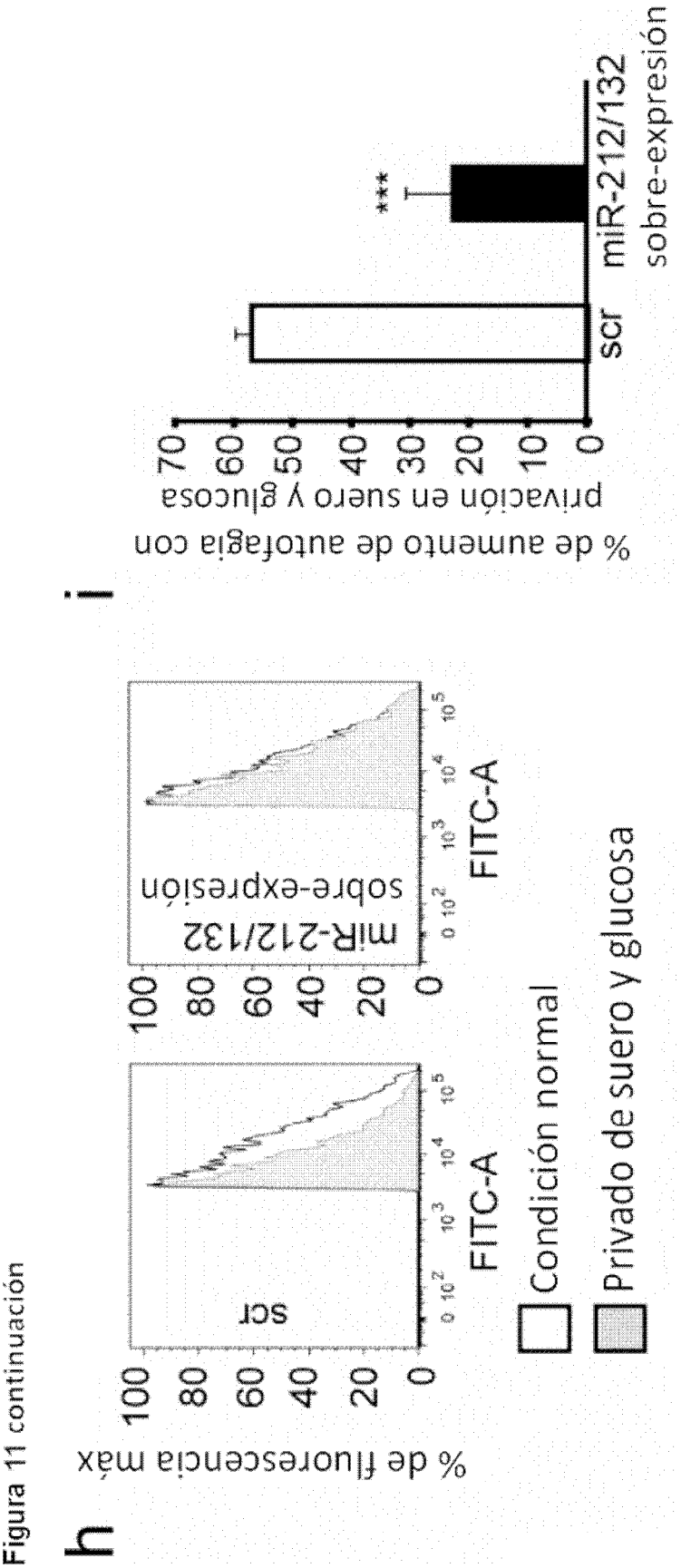
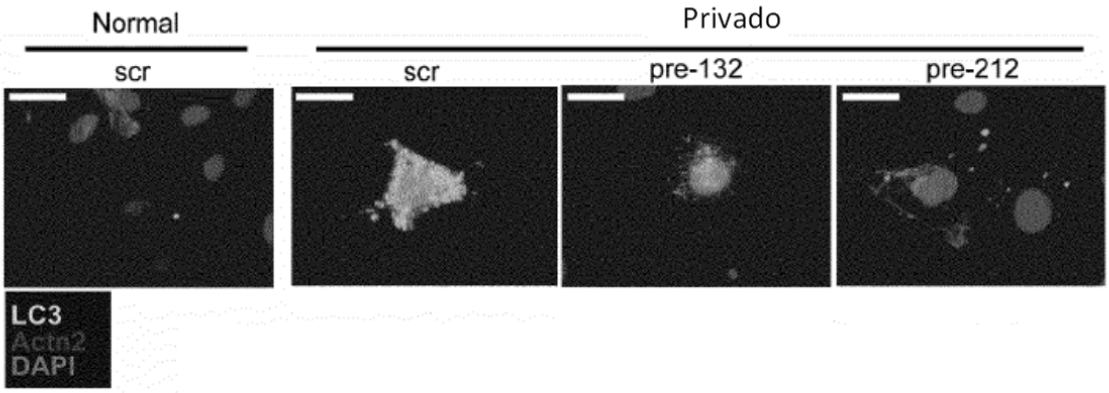
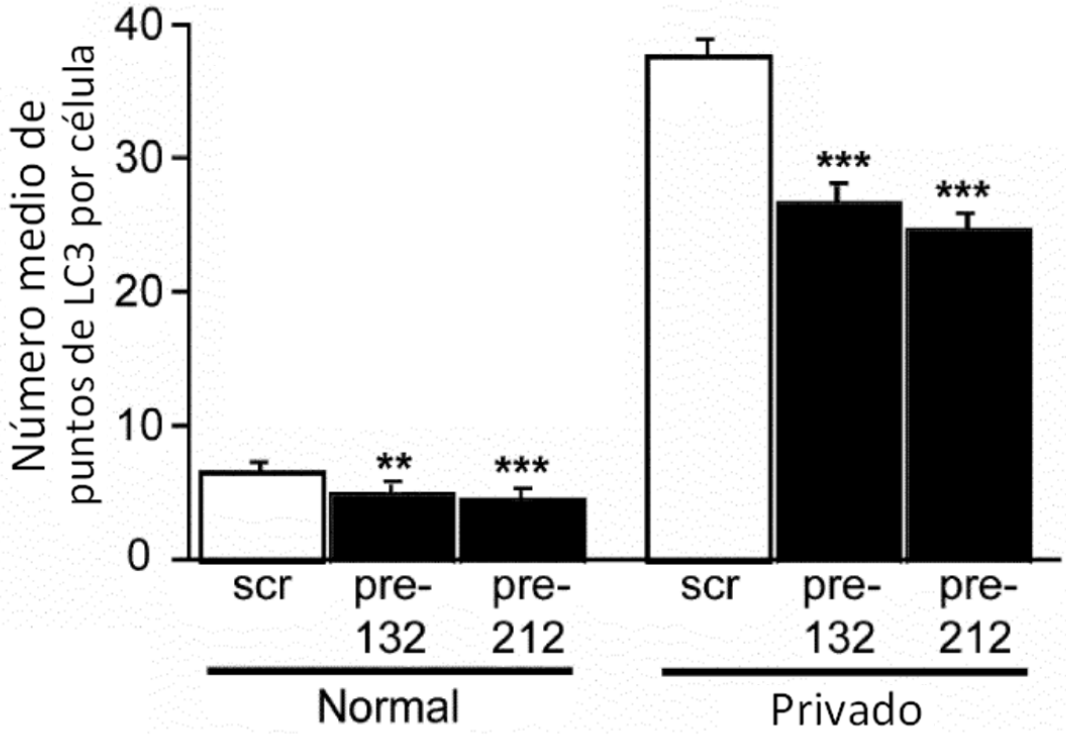



Figura 11 continuación

**Figura** 12


Normal
Privado
scr
scr
pre-132
pre-212
LC3
Actn2
DAPI


Número medio de puntos de LC3 por célula
40
30
20
10
0
**
***
***
scr
pre-132
pre-212
scr
pre-132
pre-212
Normal
Privado

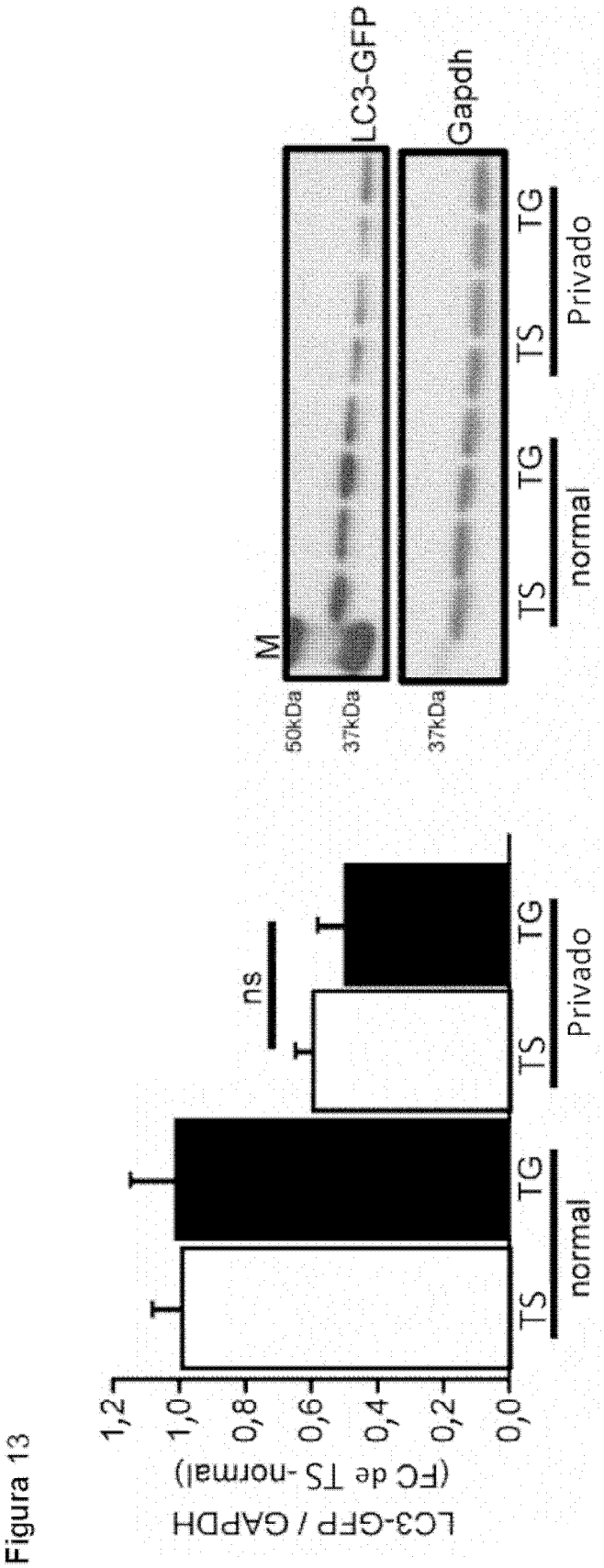
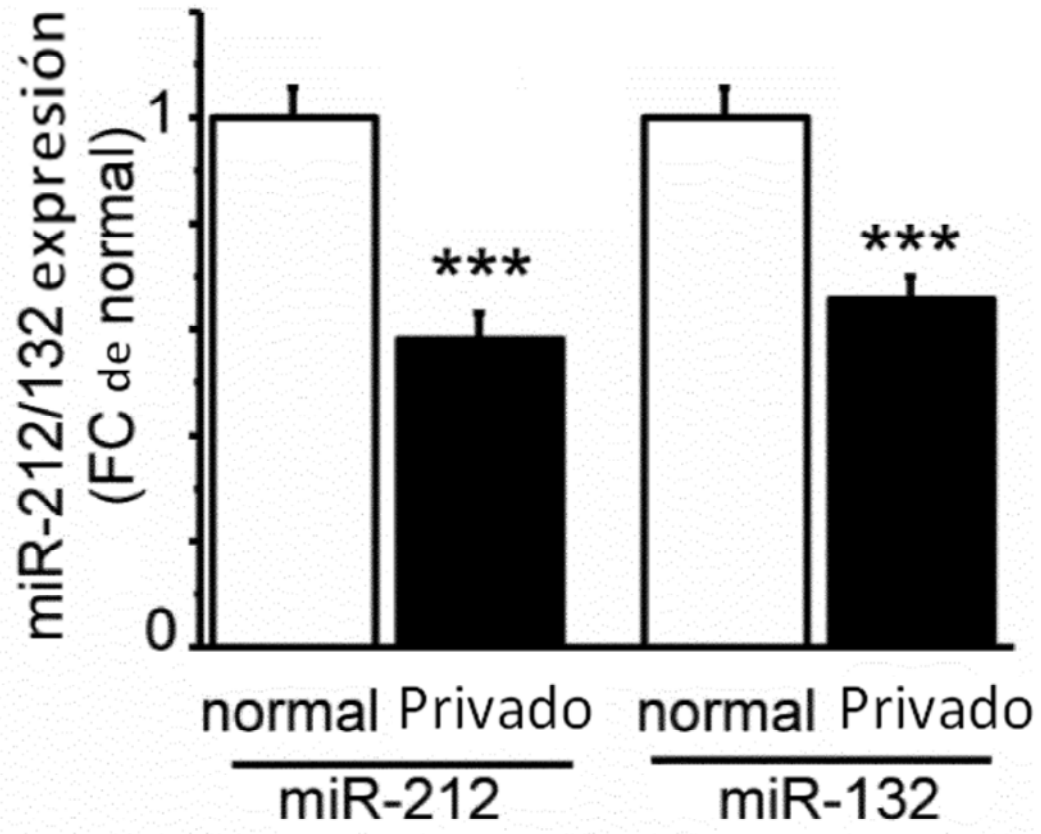
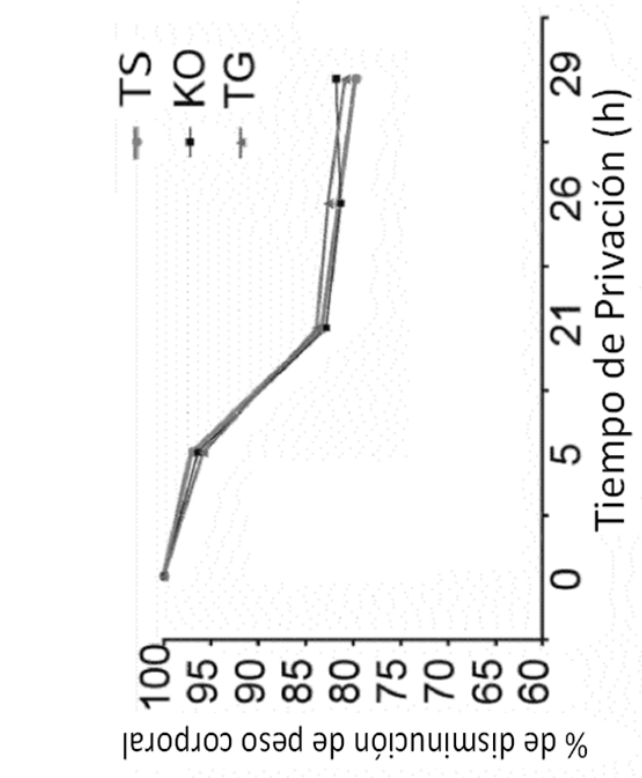

LC3-GFP / GAPDH
(FC de TS -normal)
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
ns
TS
TG
normal
Privado
M
50kDa
37kDa
LC3-GFP
Gapdh
37kDa

Figura 13

Figura 14


miR-212/132 expresión
(FC de normal)
1
0
***
***
normal Privado
normal Privado
miR-212
miR-132


TS
KO
TG
100
95
90
85
80
75
70
65
60
% de disminución de peso corporal
0
5
21
26
29
Tiempo de Privación (h)

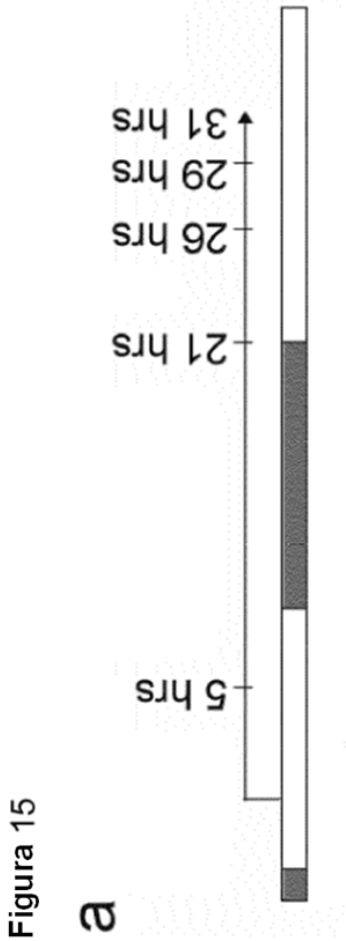

a
5 hrs
21 hrs
26 hrs
29 hrs
31 hrs

Figura 15

Figura 15 continuación

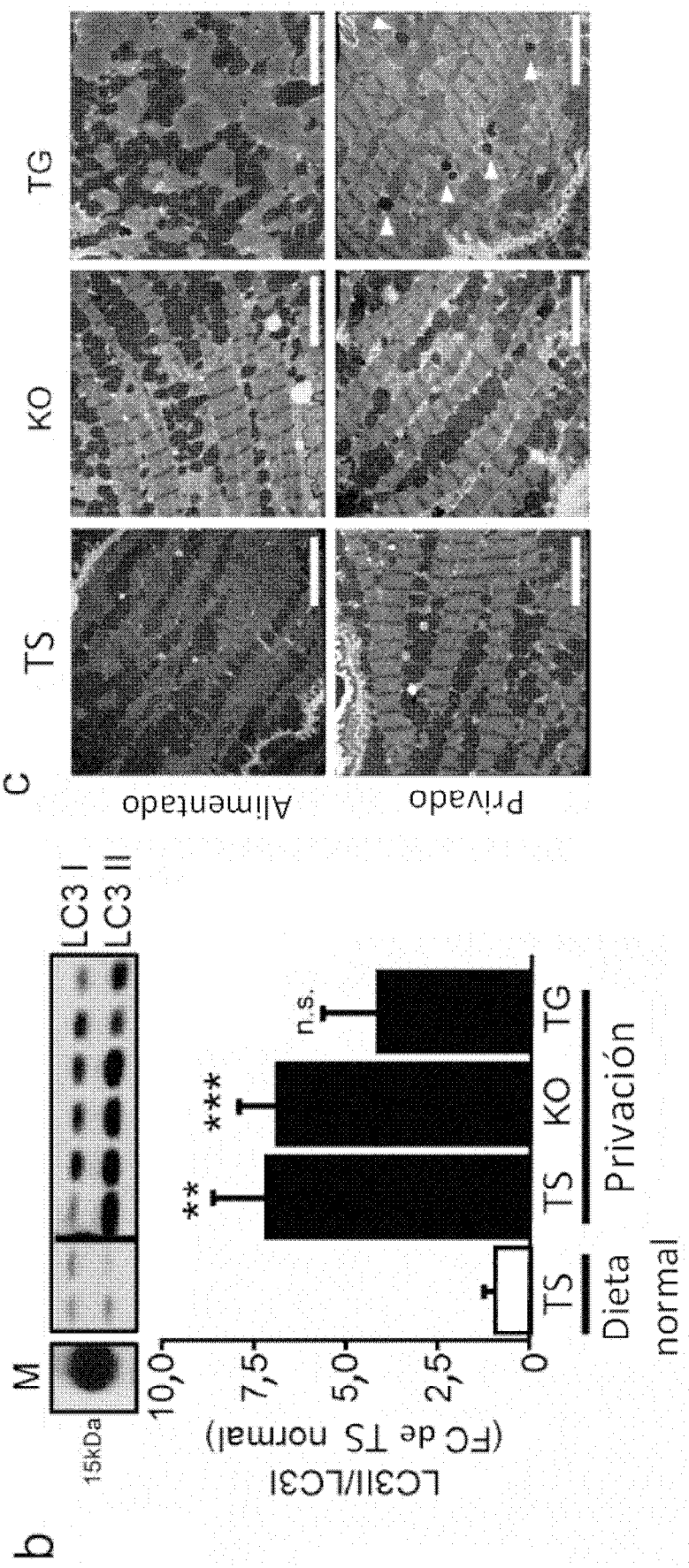
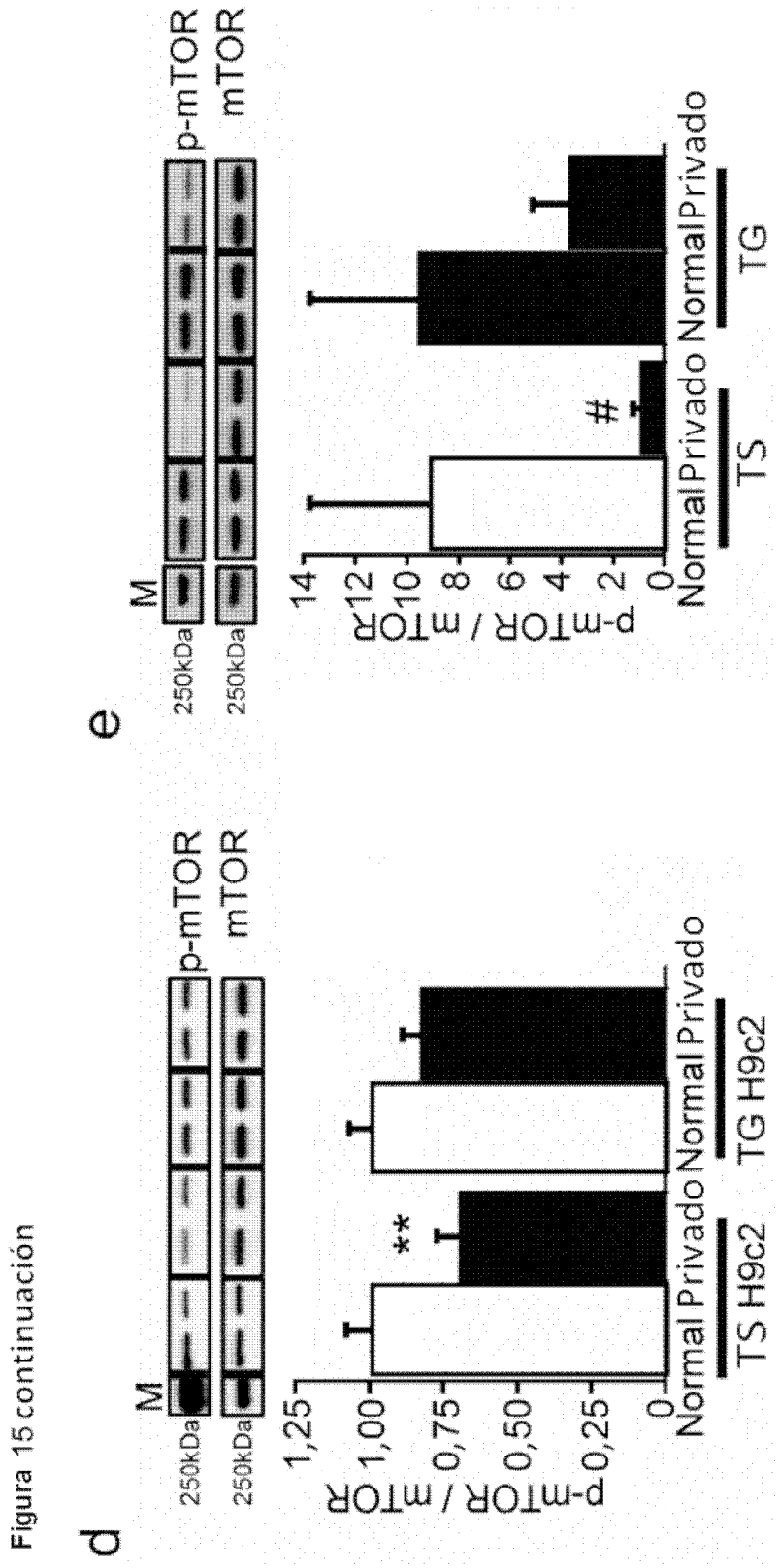


Figura 15 continuación



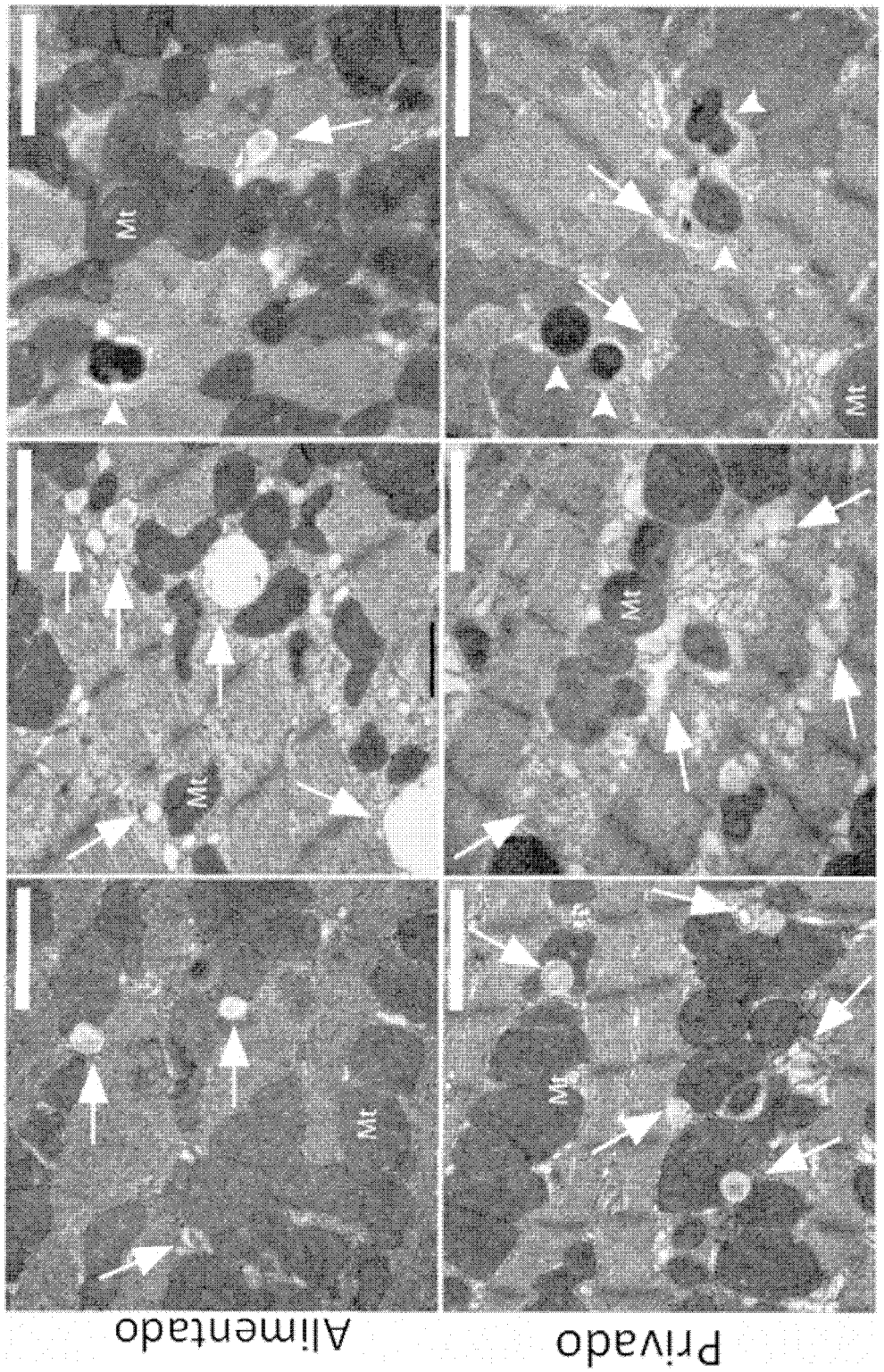



Figura 16

Figura 17

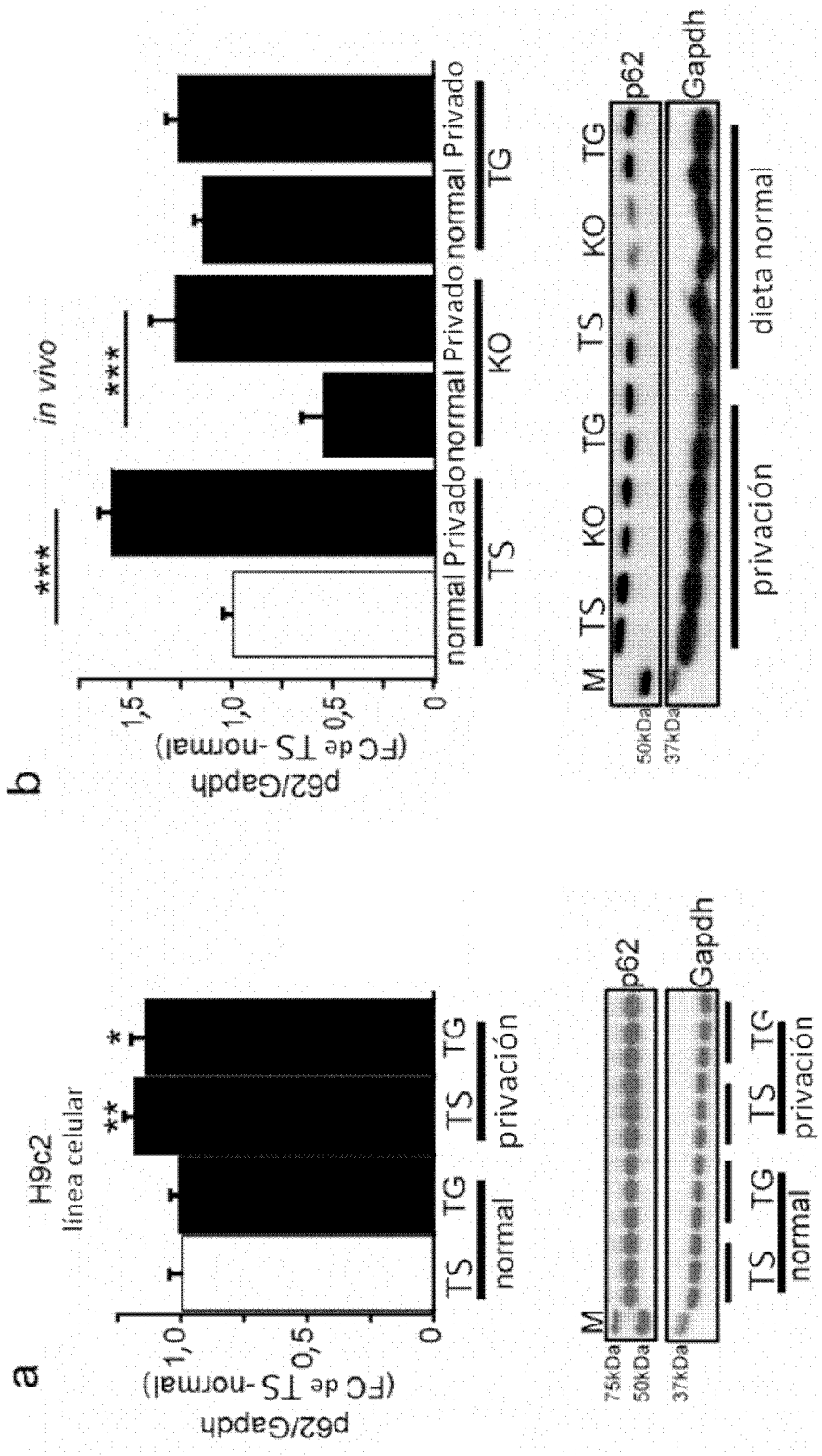

a
H9c2
línea celular
p62/Gapdh
(FC de TS -normal)
1,0
0,5
0
**
*
TS
TG
TS
TG
normal
privación
M
75kDa
50kDa
p62
37kDa
Gapdh
TS
TG
TS
TG
normal
privación
b
in vivo
***
***
p62/Gapdh
(FC de TS -normal)
1,5
1,0
0,5
0
normal
Privado
normal
Privado
normal
Privado
TS
KO
TG
M
TS
KO
TG
TS
KO
TG
50kDa
p62
37kDa
Gapdh
privación
dieta normal

Figura 18

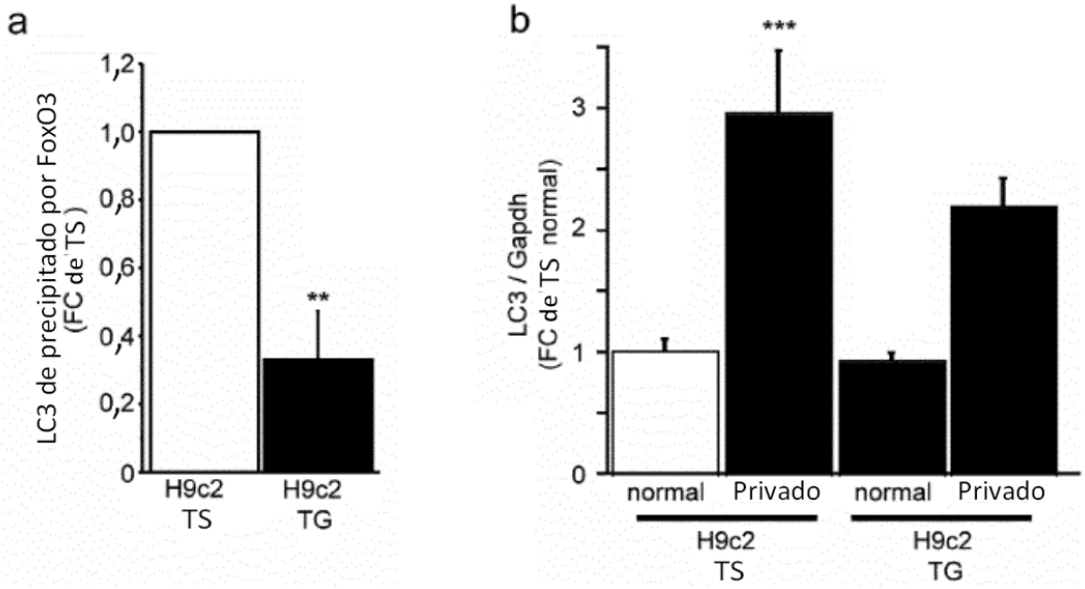
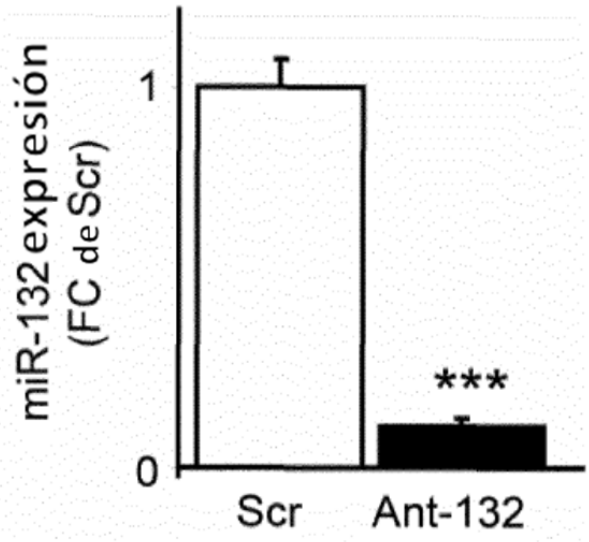

a
LC3 de precipitado por FoxO3
(FC de TS )
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0
**
H9c2
TS
H9c2
TG
b
LC3 / Gapdh
(FC de TS normal)
3
2
1
0
***
normal
Privado
normal
Privado
H9c2
TS
H9c2
TG

**Figura** 19



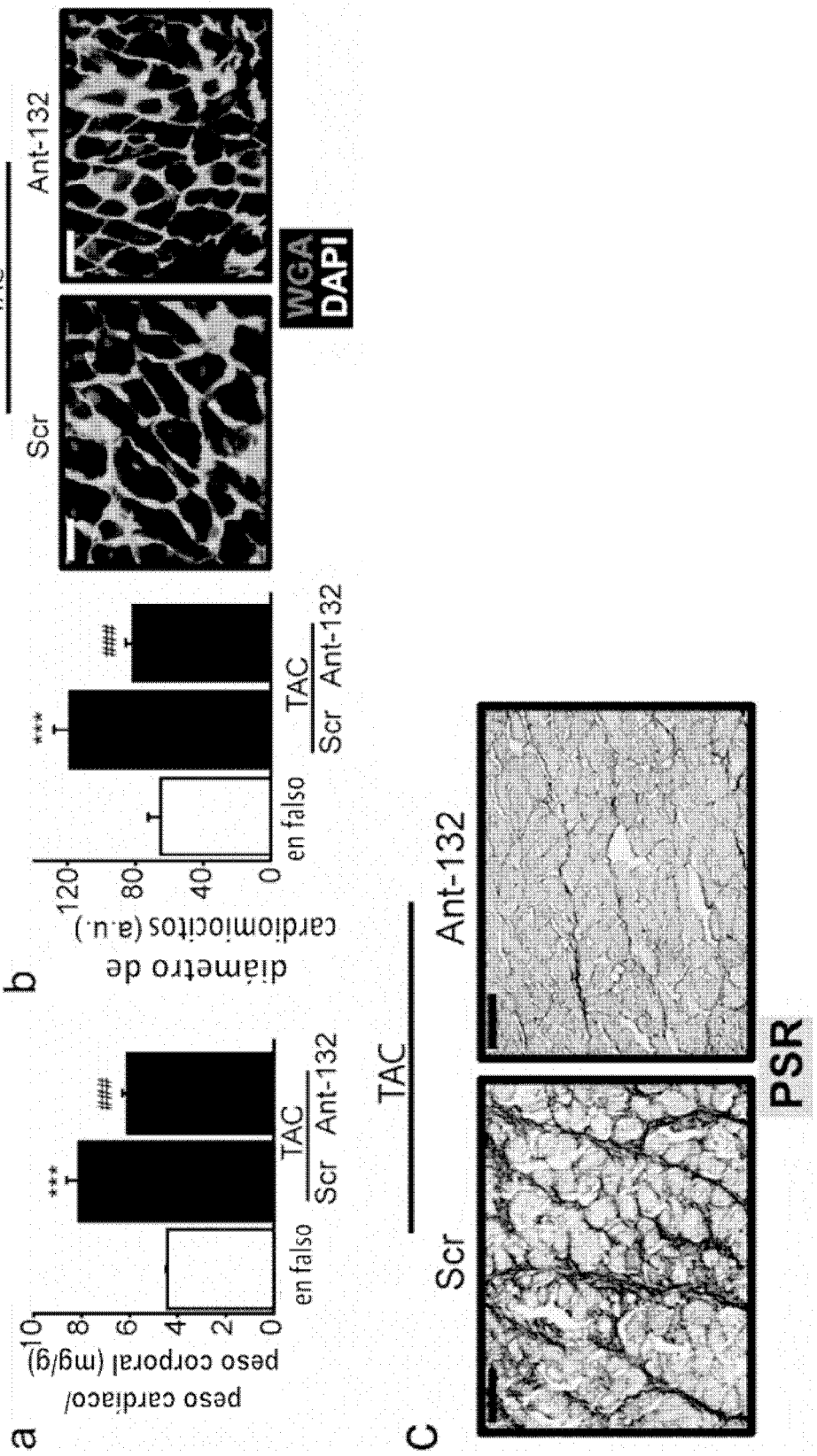

a
peso cardiaco/
peso corporal (mg/g)
10
8
6
4
2
0
***
###
en falso
TAC
Scr
Ant-132
b
diámetro de
cardiomiocitos (a.u.)
120
80
40
0
***
###
en falso
TAC
Scr
Ant-132
TAC
Scr
Ant-132
WGA
DAPI
c
TAC
Scr
Ant-132
PSR

Figura 20

Figura 20 continuación

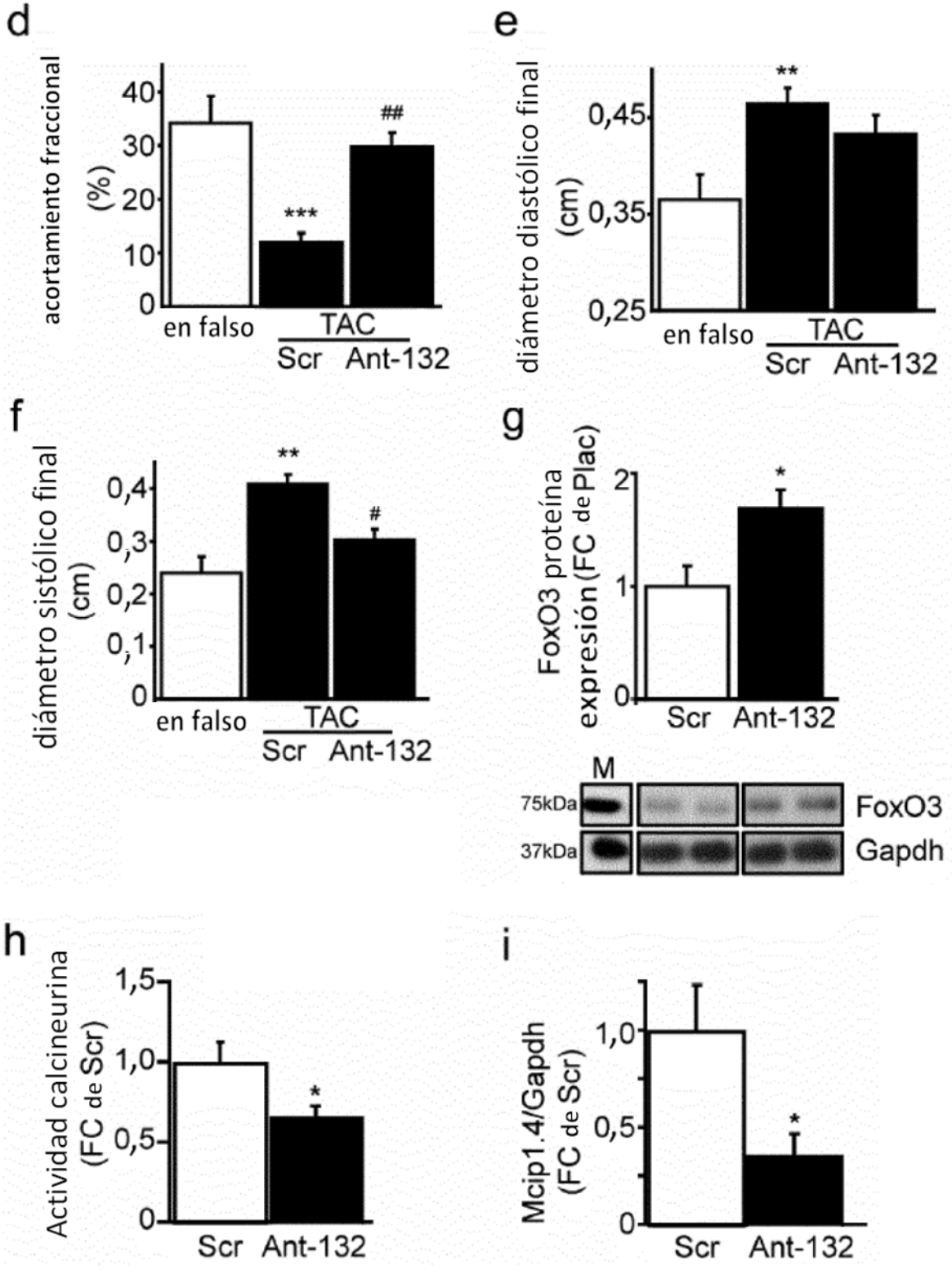
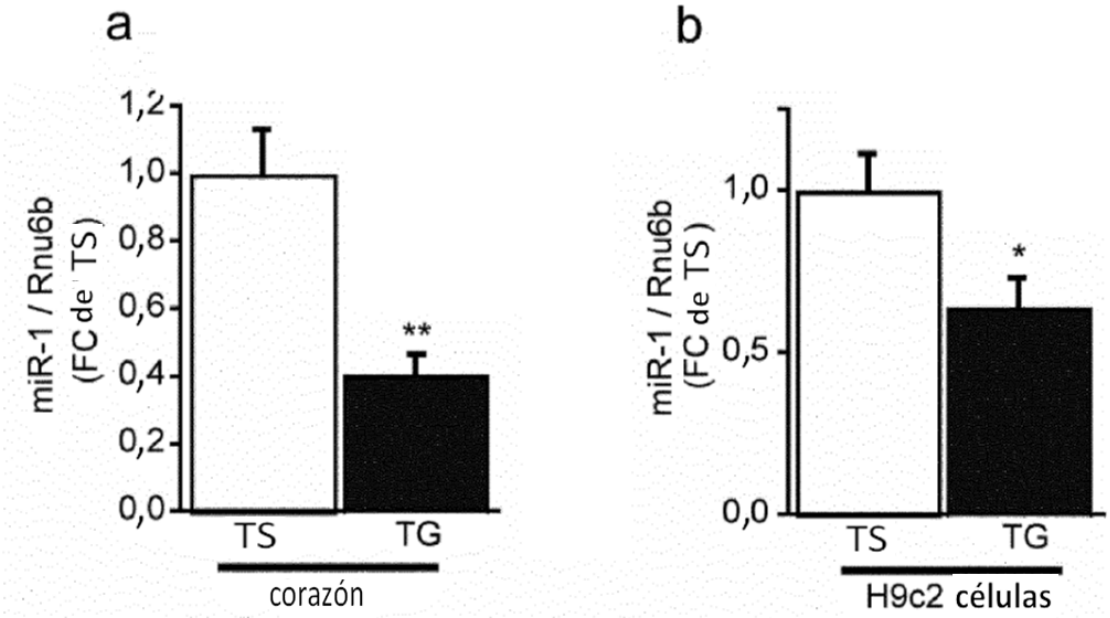


**Figura** 21


a
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
miR-1 / Rnu6b
(FC de TS)
**
TS
TG
corazón
b
1,0
0,5
0,0
miR-1 / Rnu6b
(FC de TS)
*
TS
TG
H9c2 células