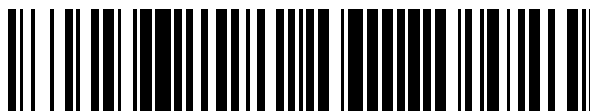


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 427**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2006.01)

A61K 31/7105 (2006.01)

C12Q 1/6883 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2012 E 17163200 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 3208338**

54 Título: **Micro-ARN MIR-15 y composiciones que lo comprenden para el tratamiento de enfermedades asociadas con la hormona liberadora de corticotropina**

30 Prioridad:

04.08.2011 US 201161514954 P

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

22.11.2019

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO.,
LTD. (100.0%)
at The Weizmann Institute of Science, P.O. Box
95
7610002 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 732 427 T3

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

DESCRIPCIÓN

Micro-ARN MIR-15 y composiciones que lo comprenden para el tratamiento de enfermedades asociadas con la hormona liberadora de corticotropina

Campo y antecedentes de la invención

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

Los trastornos del estado de ánimo, tales como la depresión mayor, representan algunos de los problemas de salud más comunes y proliferantes en todo el mundo, que afectan aproximadamente a 10% de la población. A pesar de muchas décadas de investigación, los mecanismos detrás del inicio de la depresión, la susceptibilidad y las terapias disponibles solo se entienden parcialmente. Actualmente solo aproximadamente un tercio de los pacientes responde a los tratamientos disponibles, por lo tanto, existe una gran necesidad de una mejor comprensión de la patología. El dogma actual sobre la etiología de la depresión es una interacción compleja entre los factores ambientales y la predisposición genética, lo que sugiere un papel mecanicista para los procesos epigenéticos.

La serotonina (5HT) es un neurotransmisor monoamínico producido en el cerebro por el núcleo del rafe (NR), que se proyecta ampliamente en todo el cerebro para modular una variedad de funciones cognitivas, emocionales y fisiológicas. El vínculo entre la actividad serotoninérgica no regulada y la depresión está bien establecido [Michelsen KA. et al., Brain Res Rev (2007) 55(2):329-42]. Los niveles de 5HT, así como los circuitos genéticos encargados de su producción, secreción, recaptación y desactivación, están desregulados en la depresión. Además, la mayoría de los fármacos antidepresivos actualmente disponibles se dirigen a la función de las proteínas relacionadas con el sistema 5HT, lo que da como resultado un aumento de los niveles de 5HT en la sinapsis [Krishnan V y Nestler EJ, Nature (2008) 455:894-902]. Las terapias disponibles requieren un largo período de administración antes de que se observe alivio de los síntomas.

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

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

La Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 20100222413 (de Stoffel M. et al.) describen oligonucleótidos modificados químicamente para modular la expresión de micro-ARN. El documento U.S. 20100222413 describe adicionalmente métodos para silenciar los micro-ARN (por ejemplo, miR-122, miR-16, miR-192 y miR-194) para el tratamiento de enfermedades del sistema nervioso central.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere al tema tratado como se define en las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a un miR-15, un precursor del mismo, o un polinucleótido exógeno que codifican dicho miR-15 o dicho precursor del mismo, para su uso en el tratamiento de una afección médica seleccionada del grupo que consiste en depresión, ansiedad, deterioro de la función cognitiva, ataque de pánico, comportamiento compulsivo, adicción, fobia social, trastorno del sueño, trastorno relacionado con la alimentación, trastorno del crecimiento y trastorno reproductivo.

La presente invención también se refiere a una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el miR-15 o su precursor para su uso de acuerdo con la invención, estando dicha secuencia de ácido nucleico bajo el control transcripcional de un elemento regulador que actúa en cis.

- 5 Adicionalmente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la construcción de ácido nucleico para su uso de acuerdo con la invención y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptables.

La presente invención también se refiere a una célula aislada que comprende una construcción de ácido nucleico que expresa el miR-15 o su precursor bajo el control transcripcional de un elemento regulador que actúa en cis para su uso de acuerdo con la invención. Preferiblemente, dicha célula es una célula glial.

La presente invención también se refiere a la construcción de ácido nucleico para su uso de acuerdo con la invención, o a la célula aislada de acuerdo con la invención, en donde dicho elemento regulador que actúa en cis es activo en una célula glial o una célula cardíaca.

La presente invención también se refiere al miR-15 para su uso de acuerdo con la invención, a la construcción de ácido nucleico de acuerdo con la invención, o a la célula aislada de acuerdo con la invención, en donde dicho miR-15 es el indicado en SEQ ID NO: 77-80.

Adicionalmente, la presente invención se refiere al miR-15 para su uso de acuerdo con la invención, a la construcción de ácido nucleico de acuerdo con la invención o la célula aislada de acuerdo con la invención, en donde dicho miR-15 comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en un esqueleto modificado, un enlace internucleosídico modificado y una base modificada. Preferiblemente, dicho esqueleto modificado comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en un fosforotioato, un fosforotioato quiral, un fosforoditioato, un fosfotriéster, un aminoalquilfosfotriéster, un metilfosfonato, un alquilfosfonato, un fosfonato quiral, un fosfinato, un fosforamidoato, un aminoalquilfosforamidoato, un tionofosforamidoato, un tioalquilfosfonato, un tioalquilfosfotriéster, un boranofosfato, un fosfodiéster, un ácido peptidonucleico (PNA) y un 2'-O-metoxietilo.

La presente invención también se refiere al miR-15 o al uso de acuerdo con la invención, a la construcción de ácido nucleico de acuerdo con la invención, o a la célula aislada de acuerdo con la invención, en donde dicho miR-15 comprende una modificación tanto en un azúcar como en un enlace internucleosídico.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente descripción, se proporciona un método para tratar una afección médica en el que un aumento del nivel de serotonina es terapéuticamente beneficioso en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar o expresar en una célula del sujeto un polinucleótido exógeno que codifica al menos un microARN o un precursor del mismo, en donde el microARN se selecciona del grupo que consiste en miR-135, miR-335, miR-26 y miR-182, tratando así la afección médica.

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

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

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

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

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente descripción, se proporciona un método para tratar una afección médica en la que un nivel bajo de adrenalina o noradrenalina es terapéuticamente beneficioso en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar o expresar en una célula del sujeto un polinucleótido exógeno que codifica un miR-19 o un precursor del mismo, tratando así la afección médica.

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

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

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

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

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

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

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

35 De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente descripción, se proporciona un método para tratar una afección médica en el que un nivel bajo de receptor de glutamato es terapéuticamente beneficioso en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar o expresar en una célula del sujeto un polinucleótido exógeno que codifica un miR-181 o un precursor del mismo, tratando así la afección médica.

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

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

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

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

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

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente descripción, se proporciona un método de regulación de la expresión de un gen de triptófano hidroxilasa 2 (Tph2) en una célula glial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o la expresión de un microARN o un precursor del mismo en la célula glial, en donde el microARN se selecciona del grupo que consiste en miR-181 y miR27, regulando así la expresión del gen de Tph2.

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

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

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente descripción, se proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico para regular a la baja una expresión de un microARN o un precursor del mismo, en donde el microARN o un precursor del mismo se selecciona del grupo que consiste en miR-181 y el miR-27, la secuencia de ácido nucleico está bajo el control transcripcional de un elemento regulador que actúa en cis.

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

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente descripción, se proporciona un método para regular la expresión de un gen del receptor inhibitor de serotonina 1a (Htr1a) en una célula glial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o la expresión de un micro-ARN o un precursor del mismo en la célula glial, en donde el microARN se selecciona del grupo que consiste en miR-135, miR-335, miR-181, miR-182 y miR-26, regulando así la expresión del gen de Htr1a.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente descripción, se proporciona un método de regulación de la expresión de un gen de la Molécula de Adhesión Celular del Síndrome de Down (Dscam) en una célula glial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o la expresión de un miR-182 o un precursor del mismo en la célula glial, regulando así la expresión del gen de Dscam.

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

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

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente descripción, se proporciona un método para regular la expresión de un gen de la monoaminoxilasa (MaoA) en una célula glial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o la expresión de un miR-27, regulando así la expresión del gen de MaoA.

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

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente descripción, se proporciona un método de regulación de la expresión de un gen del receptor cannabinoide tipo 1 (CB1) en una célula glial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o la expresión de un miR-19 o un precursor del mismo en la célula glial, regulando así la expresión del gen de CB1.

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

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

regulando así la expresión del gen de FKBP5.

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

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

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

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente descripción, se proporciona un método para controlar el tratamiento de un fármaco antidepresivo, comprendiendo el método: (a) tratar a un sujeto que lo necesite con un fármaco antidepresivo; y (b) medir un nivel de expresión de un miR-135 en la sangre del sujeto antes y después del tratamiento, en donde un nivel de expresión más bajo del miR-135 después del tratamiento con el medicamento antidepresivo en comparación con el nivel de expresión del miR-135 antes del tratamiento con el fármaco antidepresivo es indicativo del tratamiento eficaz.

De acuerdo con un aspecto de algunas realizaciones de la presente descripción, se proporciona un método para diagnosticar una afección médica relacionada con serotonina en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método medir un nivel de expresión de un miR-135 en una sangre del sujeto, en donde un alto nivel de expresión del miR-135 en comparación con el de una muestra de sangre de un sujeto sano es indicativo de la afección médica asociado a la serotonina.

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, la célula es una célula glial.

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, la célula glial es una neurona serotoninérgica.

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, el miR-135 es el establecido en SEQ ID NO: 58-62.

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, el miR-335 es el establecido en SEQ ID NO: 63-64.

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, el miR-26 es el establecido en SEQ ID NO: 65-69.

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, el miR-182 es el establecido en SEQ ID NO: 70-71.

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

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

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, la célula es una célula glial o una célula cardíaca.

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, el miR-19 es el establecido en SEQ ID NO: 72-76.

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

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, el miR-15 es el establecido en SEQ ID NO: 77-80. De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, la afección médica se selecciona del grupo que consiste en depresión, ansiedad, estrés, fatiga, deterioro de la función cognitiva, ataque de pánico, comportamiento compulsivo, adicción, fobia social, trastorno del sueño, trastorno relacionado con la alimentación, trastorno del crecimiento y trastorno reproductivo.

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, el polinucleótido está bajo el control transcripcional de un

elemento regulador que actúa en cis activo en una célula glial.

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, el polinucleótido está bajo el control transcripcional de un elemento regulador que actúa en cis activo en una célula cardíaca.

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, el miR-181 es el establecido en SEQ ID NO: 85-94.

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

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, el elemento regulador que actúa en cis está activo en una célula glial o una célula cardíaca.

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

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, cuando la regulación comprende la regulación por incremento de la expresión del gen Tph2, la modulación comprende la regulación por disminución del miR-181 y/o el miR-27 en la célula glial.

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, el método comprende adicionalmente medir una expresión del gen Tph2 después de la regulación por disminución del miR-181 y/o el miR-27 en la célula glial.

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

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

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, el método comprende adicionalmente medir una expresión del gen de Slc6a4 después de la regulación por incremento del miR-135 y/o miR-335 en la célula glial.

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, cuando la regulación comprende la regulación por disminución la expresión del gen de Httla, la modulación comprende la regulación por incremento de miR-135, miR-335, miR-181, miR-182 y/o miR-26 en la célula glial.

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, el método comprende adicionalmente medir una expresión del gen de Httla después de la regulación por incremento del miR-135, miR-335, miR-181, miR-182 y/o miR-26 en la célula glial.

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, cuando la regulación comprende la regulación por disminución de la expresión del gen MaoA, la modulación comprende la regulación por incremento del miR-27 en la célula glial.

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, el método comprende adicionalmente medir una expresión del gen MaoA después de la regulación por incremento del miR-27 en la célula glial.

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, cuando la regulación comprende la regulación por disminución de la expresión del gen Adrb1, la modulación comprende la regulación por incremento del miR-19 en la célula glial o la célula cardíaca.

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, el método comprende adicionalmente medir una expresión del gen Adrb1 después de la regulación por incremento del miR-19 en la célula glial o la célula cardíaca.

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, cuando la regulación comprende la regulación por disminución de la expresión del gen CB1, la modulación comprende la regulación por incremento del miR-19 en la célula glial.

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, el método comprende adicionalmente medir una expresión del gen CB1 después de la regulación por incremento de CB1 en la célula glial.

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

- 5 De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, el método comprende adicionalmente medir una expresión del gen del receptor de tipo 1 de CRH después de la regulación por incremento del miR-15 en la célula glial.

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, cuando la regulación comprende la regulación por disminución de la expresión del gen FKBP5, la modulación comprende la regulación por incremento del miR-15 en la célula glial.

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, el método comprende adicionalmente medir una expresión del gen FKBP5 después de la regulación por incremento del miR-15 en la célula glial.

- 15 De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, el método comprende adicionalmente obtener una muestra de sangre del sujeto antes del tratamiento.

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

De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, la afección médica asociado a la serotonina es un trastorno psiquiátrico

- 25 De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, el trastorno psiquiátrico se selecciona del grupo que consiste en depresión, ansiedad, estrés, fatiga, deterioro de la función cognitiva, ataque de pánico, comportamiento compulsivo, adicción, fobia social, trastorno del sueño y trastorno relacionado con los alimentos.

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

- 30 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y/o científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que se refiere la invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria se pueden usar en la práctica o en el ensayo de las realizaciones de la invención, a continuación se describen métodos y/o materiales ilustrativos.
- 35 En caso de conflicto, prevalecerá la memoria descriptiva de la patente, incluidas las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son meramente ilustrativos y no se pretende que sean necesariamente limitantes.

Breve descripción de los dibujos

- 40 Algunas realizaciones de la invención se describen en la presente memoria, solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Haciendo referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se subraya que las indicaciones mostradas son a título de ejemplo y con fines de análisis ilustrativo de las realizaciones de la invención. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente para los expertos en la técnica cómo se pueden poner en práctica las realizaciones de la invención.

45 En los dibujos:

- Las FIG. 1A-I representan la expresión de microARN en las neuronas serotoninérgicas (5HT). La Figura 1A es una ilustración gráfica de los miARN expresados diferencialmente en las neuronas 5HT. Los valores normalizados de Lowess se representan como la multiplicidad de cambio en $\ln 2$ de la intensidad del punto representada frente a las intensidades logarítmicas medias (gráfico MA); la Figura 1B es una validación de los resultados de la matriz en la PCR en tiempo real de miR que indica aumento de los niveles de miR-375 en las neuronas 5HT en comparación con el control. $n = 5$ células 5HT, $n = 4$ no 5HT. Las barras representan la media $\pm$ e.t.m.. $**P = 0,0071$; la Figura 1C es una validación de los resultados de la matriz en la PCR en tiempo real de miR que indica reducción niveles de miR-135a en las neuronas 5HT en comparación con el control. $N = 5$ células 5HT, $n = 4$ no 5HT. $**P = 0,0075$; la Figura 1D es un diagrama de Venn que representa las predicciones bioinformáticas de cruce para Slc6a4 con los resultados de las micromatrices de 5HT y una lista de los miR seleccionados para las pruebas *in vitro*; la Figura 1E es un diagrama de Venn que representa las predicciones bioinformáticas de cruce para Htr1a con los resultados de la micromatriz de 5HT y el listado de los miR seleccionados para las pruebas *in vitro*; la Figura 1F es un diagrama de Venn que representa las predicciones bioinformáticas de cruce para Tph2 con los resultados de las micromatrices de 5HT y una lista de los miR seleccionados para la pruebas *in vitro*; la Figura 1G es un diagrama de Venn que representa las predicciones bioinformáticas de cruce para MaoA con los resultados de las micromatrices de 5HT y una lista de los miR elegidos para las pruebas *in vitro*; la Figura 1H es un gráfico que ilustra los resultados del ensayo

del informador de luciferasa que indican que miR-181c y miR-27b pueden dirigirse a la 3'UTR de Tph2; y la Figura 1I es un gráfico que ilustra los resultados del ensayo del informador de luciferasa que indican que miR-27b se puede dirigir a Htr1a MaoA.

Las FIG. 2A-H representan la elección como diana por el microARN de la 3'UTR de Slc6a (SEQ ID NO: 25) y la 3'UTR de Htr1a (SEQ ID NO: 27). La Figura 2A es una ilustración de la elección como diana por miR-135a y miR-135b (SEQ ID NO: 24 y 26, respectivamente) de la 3'UTR de Slc6a; la Figura 2B es una ilustración de la elección como diana por miR-135a y miR-135b (SEQ ID NO: 24 y 26, respectivamente) de la 3'UTR de Htr1a; la Figura 2C es un gráfico que ilustra los resultados del ensayo del informador de luciferasa que indican que miR-135a y miR-135b pueden elegir como diana la 3'UTR de Slc6a. Los datos del ensayo de luciferasa representan la actividad de luciferasa de renilla normalizada a la actividad de un informador de luciferasa de luciérnaga co-transfectado en células HEK293 transfectadas con la 3'UTR del gen descrito y un vector vacío, o un vector que expresa de manera anormalmente alta un miR específico. Las barras representan la media $\pm$ e.t.m.. *P = 0,014, ***P = 0,0002, para miR-16 #p <0,0535, para miR-27 #P = 0,0967; la Figura 2D es un gráfico que ilustra los resultados del ensayo del informador de luciferasa que indican que miR-135a, miR-135b, miR-335, miR-181C y miR-26a pueden elegir como diana la 3'UTR de Htr1a. ***P <0,0001, **P = 0,0029; la Figura 2E es una ilustración de la conservación 3'UTR de slc6a4 de los emparejamientos de semilla para miR-135 (SEQ ID NO: 27-41); la Figura 2F es una ilustración de los emparejamientos de semilla de la 3'UTR de Htr1a para miR-135 (SEQ ID NO: 42-54), indicando que la semilla 1 aparece solo en la 3'UTR del ratón, y la semilla 2 está altamente conservada; la Figura 2G es un gráfico que ilustra que la mutación en la combinación de semillas de miR-135 en la 3'UTR de slc6a bloqueaba el efecto represor de miR-135a y miR-135b. ***P <0,0001, **P = 0,0032; y la Figura 2H es un gráfico que ilustra la mutación en los emparejamientos de semilla de miR-135 en la 3'UTR de Htr1a individualmente y ambos juntos, indicando que miR-135b elige como diana Htr1a a través de ambos emparejamientos de semilla y miR-135a solo a través de la semilla 2. ***P <0,0001.

Las FIG. 3A-J representan los niveles de miR-135a y miR-135b en diferentes condiciones. La Figura 3A es un gráfico que ilustra la regulación por disminución de los niveles de miR-135a en el NR después de estrés agudo. Las barras representan la media $\pm$ e.t.m.. (n = 8 en el grupo 0, n = 10 en el grupo 90 y n = 9 en el grupo 24) ***P <0,0001, *P = 0,0357; la Figura 3B es un gráfico que ilustra la regulación por disminución de los niveles de miR-135b en el NR después de estrés agudo. ***P <0,0001, **P = 0,0055; la Figura 3C es un gráfico que ilustra la regulación por incremento de los niveles de miR-135a en el NR después de la administración aguda y crónica de imipramina independientemente de si los ratones estuvieron expuestos a derrota social. (n = 8 en solución salina crónica de control y imipramina crónica de control, n = 7 imipramina aguda, n = 11 solución salina crónica de derrota social, n = 9 en la imipramina crónica de derrota social) **P = 0,003; la Figura 3D es un gráfico que ilustra la regulación por incremento de los niveles de miR-135b en el NR después de la administración aguda y crónica de imipramina independientemente de si los ratones estuvieron expuestos a derrota social. **P = 0,0093; la Figura 3E es un gráfico que ilustra el aumento en los niveles de miR-135a en el NR después de un SSRI de administración aguda o crónica, y no de NRI o solución salina. (n = 8 en cada grupo, aparte de la solución salina aguda n = 7) ***P <0,0001; la Figura 3F es un gráfico que ilustra los niveles de miR-135b no alterados en el NR después de un SSRI o NRI de administración aguda o crónica; la Figura 3G es un gráfico que ilustra la disminución de los niveles de miR-135a en el plasma de ratones que reciben SSRI crónico o agudo en comparación con los controles. (n = 8 en cada grupo, aparte de SSRI crónico y NRI n = 7) **P = 0,0004 para SSRI agudo comparado con solución salina aguda y **P = 0,0006 para el SSRI crónico comparado con la solución salina crónica; la Figura 3H es un gráfico que ilustra los niveles de miR-135b sin cambios en el plasma de ratones que reciben SSRI crónico o agudo en comparación con los controles; la Figura 3I es un gráfico de dispersión que demuestra los niveles de miR-135a de ratones individuales en el NR en comparación con el plasma lo que indica una correlación inversa en ratones que reciben tratamiento con SSRI o solución salina; y la Figura 3J es un gráfico de dispersión que demuestra que no hay correlación entre los niveles de miR-135b en el NR y el plasma en ratones que reciben tratamiento con SSRI en comparación con los controles.

Las FIG. 4A-H representan la expresión anormalmente alta *in vivo* de miR-135b. La Figura 4A es una ilustración esquemática de los lentivirus para la expresión anormalmente alta de miR-135b; la Figura 4B es un gráfico que ilustra los resultados de PCR en tiempo real que indican la expresión anormalmente alta de miR-135b *in vivo* en el núcleo del rafe dorsal (DRN) de ratones adultos. Las barras representan la media $\pm$ e.t.m. (n = 5 a los que se ha inyectado GFP y n = 3 miR-135 OE) P = 0,0032; las Figuras 4C-D son ilustraciones de un sitio de inyección en DRN mediante la demostración de la tinción con GFP en el sitio de las inyecciones. (Mapa de sección adoptado de Paxinos); la Figura 4E es un gráfico que ilustra la disminución del tiempo de inmovilidad en la prueba de suspensión de la cola en ratones que expresan de manera anormalmente alta miR-135b en el NR en comparación con los ratones de control. (n = 9 control n = 9 miR-135) P = 0,0088 en el minuto 3 y P = 0,00330 para el minuto 4; la Figura 4F es un gráfico que ilustra la disminución del tiempo de inmovilidad en la prueba de suspensión de la cola en ratones que expresan de manera anormalmente alta miR-135b en el NR en comparación con los ratones de control. P = 0,07351; las Figuras 4G-H son gráficos que ilustran que no hay diferencia en la locomoción de jaula de alojamiento en ratones que expresan de manera anormalmente alta miR-135b en el NR en comparación con los controles.

La FIG. 5 representa la 3'UTR de ADRb1 clonada siguiendo el gen de luciferasa. Ilustración de la 3'UTR de

ADRB1 intacta (superior), que alberga cuatro sitios de unión a miR-19 y una forma mutante (inferior) de la 3'UTR de ADRB1, que carece de los cuatro sitios de unión a miR-19, clonada aguas abajo con respecto al gen de la luciferasa en el plásmido Psicheck2.

Las FIG. 6A-E representan que miR-19b elige como diana la 3'UTR de ADRB1 a través de emparejamientos de semilla en su 3'UTR; las Figuras 6A-B son gráficos que ilustran los niveles de luciferasa normalizados medidos en células HT22 que expresan bajos niveles endógenos de miR-19 después de la transfección con el plásmido de GFP (Figura 6A) o el plásmido de expresión anormalmente alta de pre-miR-19b (Figura 6A); las Figuras 6C-E son gráficos que ilustran los niveles de luciferasa normalizados medidos en células HEK293T que expresan altos niveles de miR-19 endógenos. Transfección con el plásmido de control (Figura 6C), sonda modificada para reducir la expresión del gen de miR-19b (KD "knockown") (Figura 6D) o sonda con nucleótidos desorganizados ("scrambled") como control y transfección (Figura 6E) con el plásmido de miR-19b miArrest o plásmido miArrest de control. ***P <0,005. La actividad de luciferasa de Renilla se normalizó mediante los niveles de expresión de luciferasa de luciérnaga y se presentó como la razón de la actividad alcanzada por la forma mutante de la 3'UTR de ADRB1 (ADRB1-mut) en presencia del tratamiento de control.

Las FIG. 7A-D representan la expresión diferencial de miARN en la amígdala. Las Figuras 7A-B son gráficos que ilustran la expresión diferencial de miARN en la amígdala 90 minutos después del estrés agudo. La Figura 7A ilustra los resultados de una matriz Agilent. La Figura 7b ilustra los resultados de la matriz Affymetrix. Los valores normalizados se representan como una razón log2 (estrés frente a control) de la intensidad del punto representada en función de las intensidades promedio en todas las condiciones (N = 2,2). La intensidad de cada miARN se calculó como la intensidad normalizada promedio en todas las repeticiones biológicas. miR-15a y miR-15b están indicados en color rojo. miR-124, un marcador neuronal bien establecido no afectado por el protocolo de estrés está indicado en color blanco; la Figura 7C ilustra que miR-15a y miR-15b tienen un emparejamiento de semilla semiconservado en la 3'UTR del receptor de la hormona liberadora de corticotropina [CRHR1, adaptado de targetscan(dot)org]; y la Figura 7D es un gráfico que ilustra la actividad de la luciferasa medida en células HEK293T co-transfectadas con el plásmido de expresión anormalmente alta miR-15b-EGFP o que expresa GFP de y un plásmido informador de luciferasa controlado por la 3'UTR de CRFR1. La actividad de luciferasa de Renilla se normalizó mediante los niveles de expresión de luciferasa de luciérnaga.

La FIG. 8 es un gráfico que ilustra los resultados del ensayo del informador de luciferasa que indica que miR-182 probablemente se refiere a la 3'UTR de Htr11a. Los datos de los ensayos de luciferasa representan la actividad de luciferasa de renilla normalizada a la actividad de un informador de luciferasa de luciérnaga cotransfectado en células HEK293 transfectedas con la 3'UTR del gen descrito y un vector vacío, o un vector que expresa de manera anormalmente alta un miR específico.

FIG. 9 es un gráfico que ilustra los resultados de PCR en tiempo real de los niveles de expresión de miR-182 en ratones adultos DRN que indican una tendencia a la disminución de la expresión después de la derrota social crónica. Los datos representan la media $\pm$ ETM n = 7 controles y 18 ratones en el grupo de derrota social, # = p = 0,1.

La FIG. 10 es un diagrama de Venn que representa predicciones de bioinformática *in silico* para las dianas de miR-182 en dos algoritmos y la lista de posibles genes diana altamente relevantes para la función neuronal normal y patológica que aparecen en esta predicción.

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

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

Las FIG. 13A-D representan los niveles de miR-19 en la PFC y la amígdala de ratones sometidos a derrota social. Los niveles de miR-19a y miR-19b se midieron en muestras de amígdala tomadas de ratones que fueron sometidos a un paradigma de derrota social. Es de destacar que los niveles de miR-19a y miR-19b en la PFC se elevaron en ratones categorizados como "susceptibles" a derrota social con respecto a los ratones de control (Figura 13A y Figura 13B, respectivamente). Los niveles de miR-19 también se elevaron en la amígdala de ratones categorizados como "susceptibles" a derrota social con respecto a los ratones de control (Figura 13C y Figura 13D, respectivamente).

FIG. 14 representa miARN-19b dirigido a CB1 3'UTR. La transfección de células HT-22 con CB1 3'UTR y plásmidos que expresan de manera anormalmente alta el control de miR-19b o GFP conduce a una disminución de 50% de los niveles de luciferasa normalizados.

Las FIG. 15A-B son ilustraciones esquemáticas de una sección coronal del cerebro del ratón. La Figura 15A muestra varios núcleos en el cerebro, incluido el BLA (adaptado del cerebro del ratón por Paxinos y Franklin); la Figura 15B muestra una distribución de CB1 en el cerebro (adaptado de Allen Brain Atlas www.mouse.brain-map.org/). Es de destacar que, por esta distribución, resulta evidente que CB1 es

abundante en el BLA.

La FIG. 16 es una ilustración esquemática de un mecanismo propuesto para la consolidación de la memoria en el núcleo basolateral de la amígdala (BLA). La corticosterona (CORT) se une a un receptor de glucocorticoides unido a membrana (mbGR) aún no caracterizado que activa la vía Gs-cAMP/PKA para inducir la síntesis de endocannabinoides (eCB). Los endocannabinoides se liberan a la sinapsis donde se unen a los receptores CB1 en los terminales GABAérgicos que inhiben la liberación de GABA. Esta inhibición de la liberación de GABA desinhibe la liberación de norepinefrina (NE) y aumenta la activación de NE de los receptores adrenérgicos postsinápticos, lo que aumenta la consolidación de las memorias emocionalmente aversivas.

Las FIG. 17A-B ilustran Ago2 en el complejo RISC. La Figura 17A es una ilustración esquemática de Ago2 en el complejo RISC, que media la interacción entre el miARN y el ARNm; la Figura 17B ilustra un análisis de transferencia Western realizado con anticuerpo anti-Ago2. Esta IP fue específica para la proteína Ago2, como se puede observar al comparar la muestra de cerebro total que se precipitó una vez con el anticuerpo Ago2 y una vez con el control de IgG1. Es de destacar que no se detectó la proteína Ago2 en las muestras precipitadas con el control de IgG1.

Las FIG. 18A-D representan una prueba de evitación social. Los ratones se colocaron en un laberinto durante 3 minutos solos para la habituación (Figura 18A y Figura 18B) y se registró y trazó su movimiento. Después de 3 minutos, se colocó un nuevo ratón ICR en la cámara al lado del ratón examinado (Figura 18C y Figura 18D) y se registró y representó nuevamente el movimiento del ratón examinado.

La FIG. 19A representa una ilustración de mapa de calor de miARN seleccionados regulados por incremento en las matrices.

La FIG. 19B representa una ilustración de mapa de calor de miARN seleccionados regulados por disminución en las matrices.

Las FIG. 20A-B representan una expresión log2 de miR-15a (Figura 20A) y FKBP5 (Figura 20B) a partir de los resultados de la micromatriz. Cada punto rojo se refiere a una repetición de una matriz. El grupo de control (CNT) tuvo 4 repeticiones, el grupo "Susceptible" (SUSC) tuvo 3 repeticiones y el grupo "Resiliente" (RESIL) tuvo 3 repeticiones. La línea negra mostró la media de las repeticiones en cada grupo.

La FIG. 20C representa una secuencia 3'UTR de FKBP5 de ratón (tomada de targetscan.org).

Las FIG. 21A-B representan los niveles de miR-15a de amígdala (Figura 21A) y FKBP5 (Figura 21B) en ratones "Susceptibles" con respecto a los ratones de control después del derrota social. Es de destacar que los niveles de miR-15a se elevaron en la amígdala de ratones sometidos a derrota social y se caracterizaron como "Susceptibles" (Figura 21A). Los niveles de FKBP5 disminuyeron en la amígdala de ratones sometidos a derrota social y se caracterizaron como "Susceptibles" (Figura 21B).

La FIG. 22 es una ilustración esquemática de la 3'UTR de Stx1a, Sgk1 y Adrb2, cada una de las cuales alberga un único sitio de unión a miARN-15.

La FIG. 23 representa los niveles de miR-181 de amígdala en ratones sometidos a derrota social con respecto a los ratones de control. Cabe destacar que los niveles de miR-181 se elevaron en la amígdala de ratones sometidos a derrota social.

La FIG. 24 representa diagramas de Venn que representan predicciones de bioinformática de cruce para los receptores de glutamato y miR-181.

La FIG. 25 es una ilustración esquemática de 3'UTR intactos de 6 dianas potenciales de miR-181.

La FIG. 26 representa los niveles de expresión de miR182 en el núcleo de rafe después de estrés. Es de destacar que un estrés agudo de inmovilización de 30 minutos condujo a una disminución de los niveles de expresión de miR182 en el NR cuando se sometió a ensayo 24 horas después del estrés, de acuerdo con lo medido mediante PCR en tiempo real. ** = $P < 0,01$; $n = 8$ en cada grupo.

Las FIG. 27A-C representan los resultados de un ensayo de informador de luciferasa que indica que miR182 elige como diana la 3'UTR de DSCAM, L1CAM y TSNAX. La Figura 27A ilustra datos de ensayos de luciferasa que representan la actividad de luciferasa de renilla normalizada a la actividad de un informador de luciferasa de luciérnaga co-transfectado en células N2a transfectadas con la 3'UTR de los genes descritos y un vector vacío, o un vector que expresa de manera anormalmente alta un miR específico. La mutación en el emparejamiento de semilla de miR182 en la 3'UTR de L1cam (Figura 27B) y Tsnax (Figura 27C) bloqueó el efecto represor de miR182. Las barras representan la media $\pm$ e.t.m.. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Las FIG. 28A-D representan la expresión de miR135 en la amígdala (AMY) y la corteza prefrontal (PFC). La Figura 28A ilustra que el SSRI y el NRI agudos aumentaron los niveles de miR135a en la AMY; la Figura 28B ilustra que los niveles de miR135b en la AMY estaban regulados por incremento por la administración aguda de SSRI o NRI en comparación con la solución salina; la Figura 28C ilustra que el SSRI crónico disminuyó los niveles de miR135a en la PFC; y la Figura 28D ilustra que los niveles de miR135b en la PFC fueron regulados por incremento por SSRI o NRI agudos y disminuidos por el tratamiento crónico de SSRI. $n = 7-8$ en cada grupo * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,0001$.

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

Las FIG. 30A-E representan la validación de miR135 KD *in vitro* e *in vivo*. Las Figuras 30A-B ilustran los

resultados de un ensayo de informador de luciferasa que indica que la elección como diana por miR135 de Htr1a (Figura 30A) y slc6a4 (Figura 30B) fue bloqueada por la construcción miR135b KD; la Figura 30C es una ilustración esquemática de miR135bKD y de los vectores virales de control; y las Figuras 30D-E son ilustraciones de un sitio de inyección de DRN (Figura 30D adoptada de Paxinos), y la Figura 30E es una tinción con GFP de DRN infectado con lentivirus KRRRDD-455D.

Las FIG. 31A-G representan un comportamiento similar a la ansiedad y una respuesta atenuada a SSRI en ratones miR135KD. La Figura 31A ilustra que el comportamiento de los ratones miR135KD fue similar al de los ratones de control en la prueba de campo abierto; la Figura 31B ilustra un aumento del comportamiento similar a la ansiedad en ratones miR135KD en comparación con los ratones de control en el laberinto de pulso elevado; la Figura 31C ilustra que en la prueba de transferencia de luz oscura, los ratones miR135KD de prueba pasaron más tiempo en la cámara iluminada en comparación con los ratones de control en condiciones de estrés basal, pero no después de estrés agudo; la Figura 31D ilustra que los ratones miR135KD visitaron la cámara iluminada más veces en comparación con los ratones de control, en condiciones de estrés basal, pero no después de estrés agudo; la Figura 31E ilustra que los ratones miR135KD viajaron menos distancia en la cámara iluminada en comparación con los ratones de control, en condiciones de estrés basal, pero no después de estrés agudo; la Figura 31F ilustra que no hay ninguna diferencia entre los ratones miR135KD y los ratones control en la prueba de suspensión de la cola tanto en condiciones basales como después de la administración de SSRI, aunque se observó una reducción del tiempo de inmovilidad después del tratamiento con SSRI en comparación con la condición basal en ambos grupos. (Figuras 31F-G). El tiempo de inmovilidad se redujo con el SSRI en ambos grupos, sin embargo, la reducción se atenuó en los ratones miR135KD en comparación con los controles en los últimos 2 minutos de la prueba $\sim p < 0,1$ * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $n = 10-11$ en cada grupo.

La FIG. 32 es una ilustración esquemática del sistema de expresión anormalmente alta inducible de los ratones miR135. Ratones transgénicos que expresan una parada traduccional flanqueada por Lox P ("floxed") antes de la secuencia de miR135a y el informador GFP. Los ratones transgénicos mutantes expresan miR135a solo en células positivas para ePet de 5-HT.

Las FIG. 33A-C representan la validación de una línea de ratones que expresan de manera anormalmente alta miR135 en neuronas 5-HT. La Figura 33A ilustra que miR135 se expresó de manera anormalmente alta en el NR de los ratones miR135OE en comparación con los ratones de control. Las Figuras 33B-C ilustran que el ARNm de los genes diana de miR 135 se reguló por disminución en el NR de ratones miR135OE, tanto Slc6a4 (Figura 33B) como Htr1a (Figura 33C). # $p < 0,1$ * $p < 0,05$; $n = 4$ en cada grupo

Las FIG. 34A-E representan una disminución de la ansiedad y un comportamiento similar a la depresión después del derrota social en los ratones miR135OE. La Figura 34A muestra que los ratones miR135OE tienen una disminución del comportamiento similar a la ansiedad en la prueba de campo abierto; la Figura 34B muestra menos comportamientos similar a la ansiedad en comparación con el control de los ratones miR135OE en una prueba de transferencia de luz oscura; la Figura 34C muestra un comportamiento de disminución similar a la ansiedad en comparación con el control en el laberinto de pulso elevado de los ratones miR135OE; la Figura 34D muestra la tendencia a disminuir el tiempo de inmovilidad de los ratones miR135OE en comparación con los controles en la prueba de suspensión de cola; y la Figura 34E muestra la reducción del tiempo de inmovilidad en los ratones miR135OE en comparación con los controles en la prueba de natación forzada. # $p < 0,1$ * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ $n = 7-11$ en cada grupo.

Descripción de las realizaciones específicas de la invención

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

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

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, se debe entender que la invención no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ilustrados por los Ejemplos. La invención es susceptible de otras realizaciones o de ser puesta en práctica o llevada a cabo de varias maneras. Además, se debe entender que la fraseología y la terminología empleadas en la presente memoria tienen el propósito de ser descriptivas y no se deben considerar limitantes.

El vínculo entre actividad serotoninérgica desregulada y trastornos psiquiátricos, tales como la ansiedad y la depresión, se ha establecido previamente, pero los mecanismos moleculares que subyacen a estas patologías no se conocen completamente. Los microARN (miR) son un subconjunto de pequeñas moléculas de ARN que regulan la expresión génica después de la transcripción y son abundantes en el cerebro.

Se bien la presente invención se reduce a la práctica, los autores de la presente invención han descubierto que los microARN específicos (miR) están implicados en la regulación de los genes relacionados con la serotonina (5HT) en las células gliales y, por lo tanto, están implicados en la modulación de los trastornos médicos asociados con niveles

aberrantes de serotonina, como los trastornos psiquiátricos.

Como se ilustra a continuación y en la sección de Ejemplos que sigue, los autores de la presente invención determinaron el patrón de expresión de miR en neuronas 5HT, obtenido del núcleo del rafe (NR) de ratones informadores de 5HT (ePET-YFP), empleando micromatrices de miR (véanse las Tablas 2A-B en la sección de ejemplos que sigue). El perfil de expresión de miR único de las neuronas serotoninérgicas obtenidas de la matriz se analizó bioinformáticamente para identificar los miR que supuestamente se dirigen a genes relacionados serotoninérgicos clave, tales como el transportador de serotonina (Slc6a4, Figura 1D), el receptor automático de serotonina (Htr1a, Figura 1E), triptófano hidroxilasa 2 (Tph2, Figura 1F) y monoamina hidroxilasa (MaoA, Figura 1G). La segmentación de miARN de los 3'UTR para estos genes se sometió a ensayo adicionalmente *in vitro* ilustrando los miR específicos (p. ej., miR-135) que específicamente se dirigen y regulan los genes neuronales 5HT (véanse las Figuras 1H-I y las Figuras 2C-D). Los autores de la presente invención han ilustrado adicionalmente que los niveles de expresión de miR-135 están se alteran en el NR y en plasma después de estrés agudo (Figuras 3A-D) y después del tratamiento con antidepresivos (Figuras 3E-J). *En vivo* la expresión anormalmente alta de miR-135 en el NR de ratones adultos redujo los comportamientos similares a la depresión después de la derrota social (Figuras 4A-H). Además, los autores de la presente invención han ilustrado la actividad de miR-182 como regulador de la actividad neuronal (a través de la represión directa de Htr1a, Figura 8) y del comportamiento psicopatológico (Figura 9) y de miR-15 como regulador de la respuesta al estrés [a través de represión de CRH1R (Figuras 7A-B), proteína de unión 5 FK506 (FKBP5) (Figuras 21A-B) y Stx1a, Sgk1 y Adrb2 (Figura 22)]. Los autores de la presente invención también han ilustrado la elección como diana específica del receptor beta adrenérgico (Adrb1) y el receptor cannabinoide 1 (CB1) por miR-19. La expresión anormalmente alta de miR-19 reprimió Adrb1 (Figuras 6A-C), mientras que la reducción de la expresión de miR-19 mejoró la expresión de Adrb1 (Figuras 6D-E). La expresión anormalmente alta de miR-19 también reprimió CB1 (Figura 14). Los autores de la presente invención también han descubierto dianas para miR-181. Específicamente, los autores de la presente invención han ilustrado que miR-181 regula específicamente los receptores de glutamato (Figuras 24 y 25). En conjunto, estos resultados justifican el uso de miARN o secuencias reguladoras de los mismos, tales como miR-135, miR-335, miR-181, miR-182, miR-26, miR-27, miR-15 y miR-19, como modalidades terapéuticas.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para tratar una afección médica en el que una elevación del nivel de serotonina es terapéuticamente beneficiosa en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método administrar o expresar en una célula del sujeto un polinucleótido exógeno que codifica al menos un microARN o un precursor del mismo.

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

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

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

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

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

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

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

El término "tratar" se refiere a inhibir o detener el desarrollo de una enfermedad, trastorno o afección y/o causar la reducción, remisión o regresión de una enfermedad, trastorno o afección o evitar que aparezca una enfermedad, trastorno o afección médica en un sujeto que puede tener riesgo de padecer el trastorno o afección médica, pero al que aún no se le ha diagnosticado un trastorno o afección médica. Los expertos en la técnica entenderán que se

pueden utilizar diversas metodologías y ensayos para evaluar el desarrollo de una enfermedad, trastorno o afección, y, de manera similar, se pueden utilizar diversas metodologías y ensayos para evaluar la reducción, remisión o regresión de una enfermedad, trastorno o afección.

5 Como se emplea en la presente memoria, el término "sujeto" incluye mamíferos, preferiblemente seres humanos de cualquier edad que padecen la patología. Preferiblemente, este término abarca a individuos que tienen riesgo de desarrollar la patología.

10 Como se emplea en la presente memoria, la frase "afección médica en la que una elevación del nivel de serotonina es terapéuticamente beneficiosa" se refiere a una enfermedad o trastorno en los que el aumento del nivel de serotonina puede prevenir la aparición de una enfermedad o de los síntomas médicos asociados con la misma o detener la progresión de la enfermedad o los síntomas médicos asociados con la misma (como se detalla adicionalmente más adelante).

15 Como se emplea en la presente memoria, el término "serotonina" se refiere al neurotransmisor monoamínico [también denominado 5-hidroxitriptamina (5-HT)]. La serotonina se expone, p. ej., en el número CAS 50-67-9.

20 De acuerdo con una realización, se proporciona un método para aumentar el nivel de serotonina en una hendidura sináptica, comprendiendo el método administrar o expresar en una célula glial, por ejemplo, una neurona serotonérgica del sujeto, un polinucleótido exógeno que codifica al menos un microARN o un precursor del mismo.

Como se emplea en la presente memoria, el término "hendidura sináptica" se refiere a la zona entre dos neuronas a través de la cual pasan las señales eléctricas o químicas.

25 Una "célula glial" se refiere a una neurona o una célula glial (p. ej., oligodendrocitos o astrocitos).

Como se emplea en la presente memoria, el término "neurona serotonérgica" se refiere a una neurona que secreta serotonina o es capaz de recaptación de serotonina (es decir, por transportadores de serotonina expresados en sus superficies celulares).

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

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

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

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

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

50 Como se emplea en la presente memoria, el término "adrenalina" se refiere a la hormona y al neurotransmisor (también conocido como epinefrina). La adrenalina se expone, p. ej., en el número de CAS 51-43-4.

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

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

60 Como se emplea en la presente memoria, la frase "afección médica en la que un nivel bajo de hormona liberadora de corticotropina (CRH) es terapéuticamente beneficioso" se refiere a una enfermedad o trastorno en el que la disminución de la expresión o actividad de la CRH puede prevenir la aparición de una enfermedad o los síntomas médicos asociados con la misma o detener la progresión de la enfermedad o los síntomas médicos asociados con la

misma (como se detalla más adelante).

Como se emplea en la presente memoria, el término "hormona liberadora de corticotropina (CRH)" se refiere a la hormona polipeptídica y un neurotransmisor (también conocido como factor liberador de corticotropina (CRF) o corticoliberina). La CRH se expone, p. ej., en NP_000747.1.

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

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

Como se emplea en la presente memoria, el término "receptor de glutamato" se refiere a un receptor sináptico típicamente localizado en las membranas de las células neuronales (p. ej., Grm1, Grik3, Grm5, Gria2, Grik2 y Grm7). El receptor de glutamato se expone, p. ej. en NP_000822.2 [receptor ionotrópico de glutamato tipo kainato 3 (Grik3)]; NP_000817.2, NP_001077088.1, NP_001077089.1 [receptor ionotrópico de glutamato AMPA 2 (Gria2)]; NP_001159719.1, NP_068775.1, NP_786944.1 [receptor ionotrópico de glutamato de tipo kainato 2 (Grik2)]; NP_000833.1, NP_001137303.1 [receptor metabotrópico de glutamato 5 (Grm5)]; NP_000835.1, NP_870989.1 [receptor metabotrópico de glutamato 7 (Grm7)]; NP_000829.2, NP_001107801.1 [receptor metabotrópico de glutamato 1 (Grm1)].

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

Como se emplea en la presente memoria, el término "microARN o un precursor del mismo" se refiere a las moléculas de microARN (miARN) que actúan como reguladores postranscripcionales. Los microARN se procesan típicamente a partir de pre-miR (precursores pre-microARN). Los pre-miR son un conjunto de moléculas precursoras de miARN transcritas por la ARN polimerasa III que se procesan eficazmente en miARN funcionales, p. ej., tras la transfección a células cultivadas. Se puede utilizar un pre-miR para provocar una actividad específica de miARN en tipos celulares que normalmente no expresan este miARN, abordando así la función de su diana regulando por disminución su expresión en un experimento de "ganancia de función de (miARN)". Existen diseños pre-miR para todos los miARN conocidos enumerados en el Registro de miARN y se pueden diseñar fácilmente para cualquier investigación. Los microARN se pueden administrar a la célula per se o codificados a partir de una molécula precursora ligada en una construcción de ácido nucleico, Como se ha descrito adicionalmente más adelante en la presente memoria.

Se apreciará que los microARN de las presentes enseñanzas se pueden unir a, o anclar a cualquier diana de microARN, o pueden regular, procesar, interferir, aumentar, estabilizar y/o desestabilizar la misma. Una diana de este tipo puede ser cualquier molécula, incluidas, entre otras, moléculas de ADN, moléculas de ARN y polipéptidos, tales como, pero sin limitarse a, genes relacionados con la serotonina, tales como el transportador de serotonina (es decir, SERT o Slc6a4), el receptor de serotonina con efector inhibidores de tipo 1a (Htr1a), la triptófano hidroxilasa 2 (Tph2) y la monoamina hidroxilasa (MaoA); receptores de adrenalina o noradrenalina (receptores adrenérgicos tales como Adr1); Adenilato ciclasa tipo 1 (ADCY1); receptores de CRH tales como Crh1R; o cualquier otra molécula, p. ej., la proteína 5 de unión a FK506 (FKBP5), el receptor cannabinoide tipo 1 (CB1), la Molécula de Adhesión Celular de Síndrome de Down (Dscam), la proteína X asociada a Translina (Tsnax) y la Molécula de adhesión celular L1 (L1cam) se describen con mayor detalle a continuación.

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

Los métodos de la presente descripción se pueden efectuar administrando o expresando en una célula del sujeto un polinucleótido exógeno que codifica un microARN.

El término "polinucleótido" se refiere a un oligómero monocatenario o bicatenario o polímero de ácido ribonucleico (ARN), ácido desoxirribonucleico (ADN) o miméticos de los mismos. Este término incluye polinucleótidos y/u oligonucleótidos derivados de moléculas de ácidos nucleicos naturales (p. ej., ARN o ADN), polinucleótidos sintéticos y/o moléculas de oligonucleótidos compuestas de bases naturales, azúcares y enlaces internucleosídicos covalentes

(p. ej., esqueleto) como polinucleótidos y/u oligonucleótidos sintéticos que tienen porciones de origen no natural, que funcionan de manera similar a las porciones naturales respectivas.

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

Los polinucleótidos (incluidos los oligonucleótidos) diseñados de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención se pueden generar de acuerdo con cualquier método de síntesis de oligonucleótidos conocido en la técnica, que incluye tanto síntesis enzimática como síntesis en fase sólida. Los equipos y reactivos para ejecutar la síntesis en fase sólida están disponibles comercialmente, por ejemplo, de Applied Biosystems. También se puede emplear cualquier otro medio para tal síntesis; la síntesis real de los oligonucleótidos se encuentra dentro de las capacidades de un experto en la técnica y se puede lograr a través de metodologías establecidas como detallan, por ejemplo: Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001), en "Molecular Cloning: A Laboratory Manual"; Ausubel, R. M. et al., Eds. (1994, 1989), en "Current Protocols in Molecular Biology", Volúmenes I-III, John Wiley & Sons, Baltimore, Maryland; Perbal, B. (1988), en "A practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York; y Gait, M.J., ed. (1984), en "Oligonucleotide Synthesis"; utilizando química en fase sólida, p. ej., cianoetilfosforamidita seguida de desprotección, desalinización y purificación mediante, por ejemplo, un método automatizado con trilito o HPLC.

Se apreciará que se puede generar un polinucleótido que comprende una molécula de ARN empleando un vector de expresión Como se ha descrito adicionalmente a continuación.

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

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

Preferiblemente, los oligonucleótidos o polinucleótidos utilizados son aquellos modificados en la cadena principal, los enlaces internucleosídicos o las bases, Como se ha descrito ampliamente en la presente memoria.

Los ejemplos específicos de oligonucleótidos o polinucleótidos preferidos útiles de acuerdo con este aspecto de la presente invención incluyen oligonucleótidos o polinucleótidos que contienen esqueletos modificados o enlaces internucleosídicos no naturales. Los oligonucleótidos o polinucleótidos que tienen esqueletos modificados incluyen aquellos que conservan un átomo de fósforo en el esqueleto, Como se ha descrito en las Patentes de Estados Unidos Núm.: 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; y 5.625.050.

Los esqueletos de oligonucleótidos o polinucleótidos modificados preferidos incluyen, por ejemplo: fosforotioatos; fosforotioatos quirales; fosforoditioatos; fosfotriésteres aminoalquil fosfotriésteres; metil- y otros alquifosfonatos, incluidos 3'-alquifosfonatos y fosfonatos quirales; fosfinatos; fosforamidatos, incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquifosforamidatos; tionofosforamidatos; tionoalquifosfonatos; tioalquifosfotriésteres; y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos conectados 2'-5' de estos, y aquellos que tienen polaridad invertida en la que los pares adyacentes de unidades de nucleósido están unidos 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se pueden utilizar diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre de las modificaciones anteriores.

Alternativamente, los esqueletos de oligonucleótidos o polinucleótidos modificados que no incluyen un átomo de fósforo tienen esqueletos que están formados por enlaces internucleosídicos alquílicos de cadena corta o cicloalquilo, enlaces internucleosídicos mixtos y alquílicos o cicloalquílicos o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte por la porción azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metileno formacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilénimino y metilénhidracino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes componentes mixtas de N, O, S y CH₂. Como se ha descrito en las Patentes de Estados Unidos Núm.: 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439.

Otros oligonucleótidos o polinucleótidos que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención son aquellos modificados tanto en el azúcar como en el enlace internucleosídico, es decir, el esqueleto de las unidades de nucleótidos se reemplaza por nuevos grupos. Las unidades básicas se mantienen para la complementación con la diana polinucleotídica apropiada. Un ejemplo de tal mimético de oligonucleótido incluye un ácido péptidonucleico (PNA). Un oligonucleótido de PNA se refiere a un oligonucleótido donde el esqueleto de azúcar se reemplaza por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las bases se conservan y se unen directa o indirectamente a los átomos de nitrógeno azoico de la porción de amida del esqueleto. Las patentes de los Estados Unidos que ilustran la preparación de compuestos de PNA incluyen, entre otros, las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262; cada una de los cuales se incorpora en la presente memoria como referencia. Otras modificaciones del esqueleto que se pueden utilizar en la presente invención se describen en la Patente de Estados Unidos Núm. 6.303.374.

Los oligonucleótidos o polinucleótidos de la presente invención también pueden incluir modificaciones o sustituciones de bases. Como se emplea en la presente memoria, las bases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G) y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las bases "modificadas" incluyen, pero no se limitan a, otras bases sintéticas y naturales, tales como: 5-metilcitosina (5-me-C); 5-hidroximetil citosina; xantina; hipoxantina; 2-aminoadenina; derivados 6-metilicos y otros derivados alquílicos de adenina y guanina; derivados 2-propílicos y otros derivados alquílicos de adenina y guanina; 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina; 5-halouracilo y citosina; 5-propinil uracilo y citosina; 6-azouracilo, citosina y timina; 5-uracilo (pseudouracilo); 4-tiouracilo; 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas; 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo, y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos; 7-metilguanina y 7-metiladenina; 8-azaguanina y 8-azaadenina; 7-desazaguanina y 7-deszadenina; y 3-desazaguanina y 3-deszadenina. Las bases adicionales modificadas incluyen aquellas descritas en: la Patente de Estados Unidos Núm. 3.687.808; Kroschwitz, J. I., ed. (1990), "The Concise Encyclopedia Of Polymer Science and Engineering", páginas 858-859, John Wiley & Sons; Englisch et al. (1991), "Angewandte Chemie", Edición Internacional, 30, 613; y Sanghvi, Y. S., "Antisense Research and Applications," Capítulo 15, páginas 289-302, S. T. Crooke y B. Lebleu, eds., CRC Press, 1993. Tales bases modificadas son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2°C (Sanghvi, Y. S. et al. (1993), "Antisense Research and Applications", páginas 276-278, CRC Press, Boca Raton), y son sustituciones de bases actualmente preferidas, incluso más concretamente cuando se combinan con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo.

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

Tabla 1A: Secuencias de polinucleótidos de miARN

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

Como se mencionó anteriormente en la presente memoria y se muestra en la sección de Ejemplos a continuación, los micro-ARN son moléculas procesadas derivadas de precursores específicos (es decir, pre-miARN), la regulación positiva de una función específica de miARN se puede efectuar utilizando una molécula precursora de miARN específica.

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

Tales agentes polinucleotídicos precursores se administran típicamente a las células diana (p. ej., células gliales o

células cardíacas) como parte de una construcción de expresión. En este caso, el agente polinucleotídico se liga en una construcción de ácido nucleico bajo el control de un elemento regulador que actúa en cis (p. ej., un promotor) capaz de dirigir la expresión del microARN en las células diana (p. ej., células de la neuroglía o células cardíacas) de una manera constitutiva o inducible.

5 Los ejemplos de agentes polinucleotídicos de microARN de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, miR-15 (p. ej., número de acceso GenBank NR_029485 ARN), miR-19 (p. ej., número de acceso GenBank NR_029489.1), miR-26 (p. ej., números de acceso GenBank NR_029500 y NR_029499), miR-27 (p. ej., número de acceso GenBank NR_029501 ARN), miR-135 (p. ej., número de acceso GenBank NR_029677.1), miR-335 (p. ej.,
10 número de acceso GenBank NR_029899.1) miR-181 (p. ej., número de acceso de GenBank NR_029611.1) y miR-182 (p. ej., número de acceso de GenBank NR_029614).

15 Los ejemplos de promotores específicos de células neuronales incluyen, pero no se limitan a, promotor del gen de enolasa específico de neuronas, promotor de la sinapsina, promotor de la sinapsina potenciado, promotor de la calmodulina cálcica y promotor de Thy1.

Los ejemplos de promotores específicos de células cardíacas incluyen, pero no se limitan a, promotor de NCX1 cardíaco y promotor de la cadena pesada de α -miosina (α MHC).

20 Las construcciones de expresión de la presente invención también pueden incluir secuencias adicionales que lo hacen adecuado para la replicación e integración en eucariotas (p. ej., vectores lanzadera). Los vectores de clonación típicos contienen secuencias de iniciación de la transcripción y la traducción (p. ej., promotores, potenciadores) y terminadores de la transcripción y la traducción (p. ej., señales de poliadenilación). Las construcciones de expresión de la presente invención pueden incluir adicionalmente un potenciador, que puede ser
25 adyacente a, o distante de la secuencia promotora y puede funcionar regulando por incremento la transcripción de la misma.

Los elementos potenciadores pueden estimular la transcripción hasta 1.000 veces de promotores homólogos o heterólogos unidos. Los potenciadores están activos cuando se colocan aguas abajo o aguas arriba del sitio de inicio
30 de la transcripción. Muchos elementos potenciadores derivados de virus tienen una amplia gama de anfitriones y están activos en una variedad de tejidos. Por ejemplo, el potenciador del gen temprano de SV40 es adecuado para muchos tipos de células. Otras combinaciones de potenciador/promotor que son adecuadas para la presente invención incluyen aquellas derivadas del virus del polio o el citomegalovirus (CMV) humano o murino y las repeticiones largas en tándem (LTR) de varios retrovirus, como el virus de la leucemia murina, el virus del sarcoma
35 murino o de Rous, y el VIH. Véase Gluzman, Y. y Shenk, T., eds. (1983). Enhancers and Eucaryotic Gene Expression, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., que se incorpora a la presente memoria como referencia.

40 Las secuencias de poliadenilación también se pueden añadir a las construcciones de expresión de la presente invención con el fin de aumentar la eficacia de la expresión del radical detectable. Se requieren dos elementos de secuencia distintos para una poliadenilación precisa y eficaz: secuencias ricas en GU o U ubicadas aguas abajo del sitio de poliadenilación y una secuencia altamente conservada de seis nucleótidos, a saber, AAUAAA, ubicada 11-30 nucleótidos aguas arriba del sitio. Las señales de terminación y poliadenilación adecuadas para la presente
45 invención incluyen las derivadas de SV40.

Además de las realizaciones ya descritas, las construcciones de expresión de la presente invención pueden contener típicamente otros elementos especializados destinados a aumentar el nivel de expresión de ácidos nucleicos clonados o a facilitar la identificación de células que portan el ADN recombinante. Por ejemplo, varios virus
50 animales contienen secuencias de ADN que promueven la replicación extracromosómica del genoma viral en tipos de células permisivas. Los plásmidos que llevan estos replicones virales se replican episómicamente siempre y cuando los factores apropiados sean proporcionados por los genes portados en el plásmido o con el genoma de la célula anfitriona.

Las construcciones de expresión de la presente invención pueden incluir o no un replicón eucariótico. Si está presente un replicón eucariótico, el vector es susceptible de amplificación en células eucarióticas utilizando el
55 marcador seleccionable apropiado. Si la construcción no comprende un replicón eucariótico, no es posible una amplificación episómica. En cambio, el ADN recombinante se integra en el genoma de la célula modificada por ingeniería genética, donde el promotor dirige la expresión del ácido nucleico deseado.

60 La construcción de ácido nucleico se puede introducir en las células diana (p. ej., células gliales o células cardíacas) de la presente invención utilizando un vehículo/método de suministro de genes apropiado (transfección, transducción, etc.) y un sistema de expresión apropiado.

Los ejemplos de vectores de expresión de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3,

pZeoSV2 (+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41 y pNMT81, que están disponibles en Invitrogen, pCI que está disponible en Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV y pBK-CMV, que están disponibles en Strategene, pTRES, que está disponible en Clontech, y sus derivados.

5 También se pueden utilizar vectores de expresión que contengan elementos reguladores de virus eucarióticos, tales como los retrovirus. Los vectores de SV40 incluyen pSVT7 y pMT2, por ejemplo. Los vectores derivados del virus del papiloma bovino incluyen pBV-1MTHA, y los vectores derivados del virus de Epstein-Barr incluyen pHEBO y pO5. Otros vectores ilustrativos incluyen pMSG, pAV009/A⁺, pMTO10/A⁺, pMAMneo-5 y baculovirus pDSVE.

10 Los sistemas basados en lípidos se pueden utilizar para el suministro de estas construcciones en las células diana (p. ej., células gliales o células cardíacas) de la presente invención.

Los liposomas incluyen cualquier estructura sintética (es decir, no natural) compuesta por bicapas lipídicas, que encierran un volumen. Los liposomas incluyen emulsiones, espumas, micelas, monocapas insolubles, cristales
15 líquidos, dispersiones de fosfolípidos, capas lamelares y similares. Los liposomas se pueden preparar por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica [Monkkonen, J. et al., 1994, J. Drug Target, 2:299-308; Monkkonen, J. et al., 1993, Calcif. Tissue Int., 53:139-145; Lasic D D., Liposomes Technology Inc., Elsevier, 1993, 63-105. (Capítulo 3); Winterhalter M, Lasic D D, Chem Phys Lipids, septiembre1993;64 (1-3):35-43]. Los liposomas pueden estar cargados positivamente, ser neutros o estar cargados negativamente. Para la captación del Sistema de Fagocitos
20 Mononucleares (MPS), los liposomas pueden ser hidrófobos ya que el enmascaramiento hidrófilo de la membrana del liposoma (p. ej., mediante el uso de lípidos unidos a polietilenglicol y partículas hidrófilas) puede ser menos propenso a la absorción de MPS. También es preferible que los liposomas no comprendan lípidos protegidos estéricamente tales como gangliósido-GM₁ y fosfatidilinositol, ya que estos lípidos impiden la absorción de MPS.

25 Los liposomas pueden ser una sola capa lipídica o pueden ser multilamelares. Si el agente terapéutico es hidrófilo, su suministro se puede mejorar aún más utilizando vesículas unilamelares grandes debido a su mayor volumen interno. A la inversa, si el agente terapéutico es hidrófobo, su suministro se puede mejorar aún más utilizando vesículas multilamelares. Alternativamente, el agente terapéutico (p. ej., oligonucleótido) puede no ser capaz de penetrar la bicapa lipídica y, por lo tanto, permanecerá adsorbido a la superficie del liposoma. En este caso,
30 aumentar el área de superficie del liposoma puede mejorar aún más el suministro del agente terapéutico. Los liposomas adecuados de acuerdo con la invención son liposomas no tóxicos tales como, por ejemplo, los preparados a partir del fosfoglicerol fosfatidilcolina y colesterol. El diámetro de los liposomas utilizados puede oscilar entre 0,1 y 1,0 micras. Sin embargo, también se pueden utilizar otros intervalos de tamaño adecuados para la fagocitosis por células fagocíticas. Para dimensionar los liposomas, se puede utilizar la homogeneización, que se basa en la
35 energía de cizallamiento para fragmentar los liposomas grandes en otros más pequeños. Los homogeneizadores que se pueden utilizar convenientemente incluyen microfluidizadores producidos por Microfluidics de Boston, MA. En un procedimiento de homogeneización típico, los liposomas se hacen recircular a través de un homogeneizador de emulsión convencional hasta que se observan los tamaños de los liposomas seleccionados. La distribución del tamaño de partícula se puede controlar mediante la discriminación del tamaño de partícula del rayo láser
40 convencional. La extrusión de liposomas a través de una membrana de policarbonato de poro pequeño o una membrana cerámica asimétrica es un método eficaz para reducir el tamaño de los liposomas a una distribución de tamaño relativamente bien definida. Típicamente, la suspensión se cicla a través de la membrana una o más veces hasta que se alcanza la distribución de tamaño de liposoma deseada. Los liposomas se pueden extrudir a través de membranas de poros sucesivamente más pequeños para lograr una reducción gradual del tamaño de los liposomas.

45 Se puede utilizar cualquier método conocido en la técnica para incorporar un agente polinucleotídico de micro-ARN a un liposoma. Por ejemplo, el agente polinucleotídico de micro-ARN se puede encapsular dentro del liposoma. Alternativamente, puede ser adsorbido sobre la superficie del liposoma. Otros métodos que se pueden utilizar para incorporar un agente farmacéutico a un liposoma de la presente invención son los descritos por Alfonso et al., [The science and practice of pharmacy, Mack Publishing, Easton Pa 19^a ed., (1995)] y los descritos por Kulkarni et al., [J. Microencapsul.1995, 12 (3) 229-46].
50

Los liposomas utilizados en los métodos de la presente invención preferiblemente cruzan las barreras hematológicas. Por lo tanto, los liposomas de la presente invención preferiblemente no comprenden un polisacárido
55 dirigido a la barrera hematológica (p. ej., manosa) en su porción de membrana. Preferiblemente, los liposomas de la presente invención no comprenden péptidos en su porción de membrana que dirigen los liposomas a un receptor en una barrera hematológica. Los ejemplos de tales péptidos incluyen, pero no se limitan a, transferrina, insulina, IGF-1, anticuerpo anti-receptor de transferrina IGF-2, anticuerpo anti-receptor de insulina, anticuerpo anti-receptor de IGF-1 y anticuerpo anti-receptor de IGF-2.

60 Con el fin de determinar los liposomas que son especialmente adecuados de acuerdo con la presente invención, se puede realizar un ensayo de escrutinio tal como los ensayos descritos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 20040266734 y la Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 20040266734; y por Danenberg et al., en Journal of cardiovascular pharmacology 2003, 42: 671-9; Circulation 2002, 106: 599-605; Circulation 2003, 108: 2798-

804

Otros vectores no basados en lípidos que se pueden utilizar de acuerdo con este aspecto de la presente invención incluyen, entre otros, polilisina y dendrímeros.

La construcción de expresión también puede ser un virus. Los ejemplos de construcciones virales incluyen, pero no se limitan a, vectores adenovirales, vectores retrovirales, vectores virales de vaccinia, vectores virales adenoasociados, vectores virales de poliovirus, vectores de alfavirus, vectores de rabdovirus, vectores de lentivirus y vectores de herpesvirus.

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

De acuerdo con una realización, un vector lentiviral, un tipo de vector retroviral, se utiliza de acuerdo con las presentes enseñanzas. Los vectores lentivirales se utilizan ampliamente como vectores debido a su capacidad para integrarse en el genoma de células tanto que están en división como que no están en división. El genoma viral, en forma de ARN, experimenta transcripción inversa cuando el virus entra en la célula para producir ADN, que después se inserta en el genoma en una posición aleatoria por la enzima integrasa viral. El vector (un provirus) permanece en el genoma y se transmite a la progenie de la célula cuando se divide. Por razones de seguridad, los vectores lentivirales nunca llevan los genes requeridos para su replicación. Para producir un lentivirus, varios plásmidos se transfectan en una llamada línea celular de empaquetamiento, comúnmente HEK 293. Uno o más plásmidos, generalmente llamados plásmidos de empaquetamiento, codifican las proteínas del virión, tales como la cápside y la transcriptasa inversa. Otro plásmido contiene el material genético que debe ser suministrado por el vector. Se transcribe para producir el genoma viral de ARN de una sola hebra y se caracteriza por la presencia de la secuencia ψ (psi). Esta secuencia se utiliza para empaquetar el genoma en el virión.

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

Otro vector de expresión adecuado que se puede utilizar de acuerdo con este aspecto de la presente invención es el vector de adenovirus. El adenovirus es un vector de transferencia génica ampliamente estudiado y utilizado habitualmente. Las ventajas clave de un vector de adenovirus incluyen una eficacia de transducción relativamente alta de células en división y quiescentes, tropismo natural a una amplia gama de tejidos epiteliales y producción fácil de títulos elevados (Russel, W. C. (2000) *J Gen Virol* 81, 57-63). El ADN del adenovirus se transporta al núcleo, pero no se integra en él. Por lo tanto, el riesgo de mutagénesis con vectores adenovirales se minimiza, mientras que la expresión a corto plazo es particularmente adecuada para tratar células cancerosas. Los vectores adenovirales utilizados en los tratamientos de cáncer experimentales son descritos por Seth et al. (1999). "Adenoviral vectors for cancer gene therapy", páginas 103-120, P. Seth, ed., *Adenoviruses: Basic Biology to gene Therapy*, Landes, Austin, TX).

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

Cuando se introducen las construcciones de expresión de la presente invención en células diana (p. ej., células gliales o células cardíacas) por medio de infección viral, la dosis viral para infección es de al menos 10^3 , 10^4 , 10^1 , 10^6 , 10^7 , 10^1 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} o más pfu o partículas virales.

Independientemente del método o construcción empleados, se proporciona una célula aislada que comprende la construcción de ácido nucleico que codifica un microARN, como se detalla anteriormente.

Como se emplea en la presente memoria, el término "aislado" se refiere a separado, al menos parcialmente, del entorno natural, por ejemplo, el organismo humano.

De acuerdo con una realización, se proporciona una célula aislada que comprende una construcción de ácido

nucleico que expresa al menos un microARN o un precursor del mismo, en donde el microARN se selecciona del grupo que consiste en miR-135, miR-335, miR-15, miR-19, miR-26, miR-27, miR-181 y miR-182 bajo el control transcripcional de un elemento regulador que actúa en cis.

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

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

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

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

20 De acuerdo con una realización específica, la célula de la neuroglía es una neurona tal como una neurona serotoninérgica.

25 Los microARN o precursores de los mismos se deben proporcionar a las células, es decir, a las células diana (p. ej., células gliales o células cardíacas) de la presente invención *in vivo* (es decir., dentro del organismo o del sujeto) o *ex vivo* (p. ej., en un cultivo de tejidos). En caso de que las células sean tratadas. *ex vivo* el método incluye preferiblemente una etapa de administración de tales células al individuo (terapia celular *ex vivo*).

30 Para la terapia *ex vivo*, las células se tratan preferiblemente con el agente de la presente invención (p. ej., un polinucleótido que codifica un microARN), después de lo cual se administran al sujeto que lo necesita.

35 La administración de las células tratadas *ex vivo* de la presente invención se pueden efectuar utilizando cualquier ruta de introducción adecuada, tal como intravenosa, intraperitoneal, intra-renal, intra-gastrointestinal, subcutánea, transcutánea, intramuscular, intracutánea, intratecal, epidural y rectal. De acuerdo con las realizaciones actualmente preferidas, las células tratadas *ex vivo* de la presente invención se pueden introducir en el individuo empleando la administración intravenosa, intra-renal, intra-gastrointestinal y/o intraperitoneal.

40 Las células de la presente invención (p. ej., células gliales o células cardíacas) pueden derivar de fuentes autólogas o de fuentes alogénicas tales como cadáveres humanos o donantes. Dado que es probable que las células no autólogas induzcan una reacción inmunitaria cuando se administran al organismo, se han desarrollado varios enfoques para reducir la probabilidad de rechazo de células no autólogas. Estos incluyen suprimir el sistema inmunitario del receptor o encapsular las células no autólogas en membranas semipermeables inmunoaislantes antes del trasplante.

45 Las técnicas de encapsulación generalmente se clasifican como microencapsulación, que involucra pequeños vehículos esféricos, y macroencapsulación, que involucra membranas de lámina plana y fibra hueca más grandes (Uludag, H. et al. (2000). Technology of mammalian cell encapsulation. Adv Drug Deliv Rev 42, 29-64).

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

55 Por ejemplo, las microcápsulas se preparan utilizando colágeno modificado en un complejo con una cubierta de terpolímero de metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA), ácido metacrílico (MAA) y metacrilato de metilo (MMA), lo que da como resultado un espesor de cápsula de 2-5 µm. Tales microcápsulas se pueden encapsular adicionalmente con 2-5 µm adicionales de cubiertas de terpolímero para conferir una superficie lisa cargada negativamente y minimizar la absorción de proteínas plasmáticas (Chia, S. M. et al. (2002). Multi-layered microcapsules for cell encapsulation. Biomaterials 23, 849-856).

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

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

Los ejemplos de agentes inmunosupresores que se pueden utilizar junto con el tratamiento *ex vivo* incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, ciclofosfamida, ciclosporina, ciclosporina A, cloroquina, hidroxiclolorquina, sulfasalazina (sulfasalazopirina), sales de oro, D-penicilamina, azatioprina, anakinra, infliximab (REMICADE[®]), etanercept, bloqueadores de TNF alfa, un agente biológico que se dirige a una citoquina inflamatoria y un medicamento antiinflamatorio no esteroideo (AINE). Los ejemplos de AINE incluyen, pero no se limitan a, ácido acetilsalicílico, salicilato de colina y magnesio, diflunisal, salicilato de magnesio, salsalato, salicilato de sodio, diclofenaco, etodolaco, fenoprofeno, flurbiprofeno, indometacina, ketoprofeno, ketorolaco, meclofenamato, naproxeno, nabumetona, fenilbutazona, piroxicam, sulindaco, tolmetina, acetaminofeno, ibuprofeno, inhibidores de Cox-2 y tramadol.

Para la terapia *in vivo*, el agente (p. ej., un polinucleótido que codifica un microARN) se administra al sujeto per se o como parte de una composición farmacéutica. Preferiblemente, tales composiciones están formuladas para permitir el paso a través de la barrera hematoencefálica (BHE).

Los enfoques convencionales para el suministro de fármacos al sistema nervioso central (SNC) incluyen: estrategias neuroquirúrgicas (p. ej., inyección intracerebral o infusión intracerebroventricular); manipulación molecular del agente (p. ej., producción de una proteína de fusión quimérica que comprende un péptido de transporte que tiene una afinidad por una molécula de superficie de células endoteliales combinado con un agente que es incapaz de cruzar la BHE) en un intento de explotar una de las vías de transporte endógenas del BHE; estrategias farmacológicas diseñadas para aumentar la solubilidad en lípidos de un agente (p. ej., la conjugación de agentes solubles en agua con transportadores de lípidos o colesterol); y la rotura transitoria de la integridad de la BHE mediante rotura hiperosmótica (resultante de la infusión de una solución de manitol en la arteria carótida o el uso de un agente biológicamente activo tal como un péptido de angiotensina).

Los métodos para el suministro de fármacos detrás de la BHE incluyen la implantación intracerebral (por ejemplo con agujas) y la distribución mejorada por convección. El manitol se puede utilizar para evitar el BHE. Del mismo modo, se puede utilizar la administración a través de la mucosa (p. ej., nasal) para evitar la BHE.

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

Como se emplea en la presente memoria, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los ingredientes activos descritos en la presente memoria con otros componentes químicos, tales como portadores y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En la presente memoria, el término "ingrediente activo" se refiere al péptido responsable del efecto biológico.

En lo sucesivo, las frases "portador fisiológicamente aceptable" y "portador farmacéuticamente aceptable" que se pueden utilizar indistintamente se refieren a un portador o un diluyente que no causa irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. En estas frases se incluye un coadyuvante.

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

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

Las vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, administración oral, rectal, transmucosa, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, incluidas inyecciones intramusculares, subcutáneas e

intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneal, intranasales o intraoculares.

5 Alternativamente, se puede administrar la composición farmacéutica de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, a través de la inyección de la composición farmacéutica directamente a una región del tejido de un paciente.

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

15 Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención se pueden formular de manera convencional empleando uno o más portadores fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y agentes auxiliares, que facilitan el procesamiento de los ingredientes activos en preparaciones que se pueden utilizar farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la vía de administración elegida.

20 Para la inyección, los ingredientes activos de la composición farmacéutica se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosa, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que se debe penetrar. Tales penetrantes son generalmente conocidos en la técnica.

25 Para la administración oral, la composición farmacéutica se puede formular fácilmente combinando los compuestos activos con portadores farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales portadores permiten que la composición farmacéutica se formule como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones, suspensiones y similares, para la ingestión oral por parte de un paciente. Las preparaciones farmacológicas para uso oral se pueden preparar empleando un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir los agentes auxiliares adecuados si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de grageas. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carbometilcelulosa sódica; y/o polímeros fisiológicamente aceptables tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como polivinilpirrolidona entrecruzada, agar o ácido algínico o una sal de los mismos, como alginato de sodio.

35 Los núcleos de grageas están provistos de recubrimientos adecuados. Para este propósito, se pueden utilizar soluciones concentradas de azúcar que pueden contener opcionalmente goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de grageas para la identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

40 Las composiciones farmacéuticas que se pueden utilizar por vía oral incluyen cápsulas de ajuste a presión preparadas a partir de gelatina, así como cápsulas blandas selladas preparadas a partir de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los ingredientes activos mezclados con una carga tal como la lactosa, aglutinantes tales como almidones, lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los ingredientes activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizantes. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosis adecuadas para la vía de administración elegida.

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

55 Para la administración por inhalación nasal, los ingredientes activos para su uso de acuerdo con la presente invención se administran convenientemente en forma de una presentación en aerosol desde un envase presurizado o un nebulizador con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, dicloro-tetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos, p. ej., de gelatina para su uso en un dispensador se pueden formular conteniendo una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

60 La composición farmacéutica descrita en la presente memoria se puede formular para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en forma de dosis unitaria, p. ej., en ampollas o en recipientes multidosis, opcionalmente con un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en portadores oleosos

o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma soluble en agua. Además, las suspensiones de los ingredientes activos se pueden preparar como suspensiones inyectables apropiadas a base de agua o aceite. Los disolventes o portadores lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo o ésteres de ácidos grasos sintéticos tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones inyectables acuosas pueden contener sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizadores adecuados o agentes que aumentan la solubilidad de los ingredientes activos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas.

Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para la constitución con un portador adecuado, por ejemplo, una solución a base de agua estéril, libre de pirógenos, antes de su uso.

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

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en el contexto de la presente invención incluyen composiciones en donde los ingredientes activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr el propósito pretendido. Más específicamente, una cantidad terapéuticamente eficaz significa una cantidad de ingredientes activos (péptido) eficaces para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de un trastorno (p. ej., diabetes) o prolongar la supervivencia del sujeto que está siendo tratado.

De acuerdo con una realización de la presente descripción, la expresión anormalmente alta de miR-135 tiene un efecto antidepresivo.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz se encuentra dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en la presente memoria.

Para cualquier preparación utilizada en los métodos de la invención, la cantidad o dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular e in vitro. Por ejemplo, una dosis se puede formular en modelos animales para lograr una concentración o título deseado. Tal información se puede utilizar para determinar con mayor precisión las dosis útiles en los seres humanos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los ingredientes activos descritos en la presente memoria pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales in vitro, en cultivos celulares o en animales experimentales. Los datos obtenidos a partir de estos ensayos in vitro y a partir de cultivos celulares y estudios en animales se pueden utilizar para formular un rango de dosis para uso en seres humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación pueden ser elegidas por el médico individual en vista del estado del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl, et al., 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1 pág.1).

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

Dependiendo de la gravedad y la capacidad de respuesta de la afección que se vaya a tratar, la dosificación puede ser de una sola administración o de una pluralidad de administraciones, con un curso de tratamiento que puede durar desde varios días hasta varias semanas o hasta que se realice la cura o se logre una disminución del estado de la enfermedad.

La cantidad de una composición que se debe administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que se vaya a tratar, la gravedad de la afección, la forma de administración, el criterio del médico que prescribe, etc. La dosis y el momento de la administración serán sensibles para un seguimiento cuidadoso y continuo de la condición cambiante individual.

Se apreciará que existen modelos animales mediante los cuales los agentes de la presente invención se pueden probar antes del tratamiento humano. Por ejemplo, se pueden utilizar modelos animales de depresión, estrés, ansiedad, tales como el modelo de indefensión aprendida (LH), el modelo de estrés leve crónico (CMS), el modelo de estrés por derrota social (SDS) y el modelo de privación materna.

- Las composiciones de la presente invención pueden, si se desea, presentarse en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de dosificación unitaria que contienen el ingrediente activo. El envase puede, por ejemplo, comprender una lámina de metal o plástico, tal como un envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dispensador también se puede acomodar mediante una notificación asociada con el recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos, cuya notificación refleja la aprobación por parte de la agencia de la forma de las composiciones o de la administración a seres humanos o veterinaria. Tal notificación, por ejemplo, puede ser del etiquetado aprobado por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos para medicamentos recetados o de un prospecto de producto aprobado. Las composiciones que comprenden una preparación de la invención formulada en un portador farmacéutico compatible también se pueden preparar, colocar en un recipiente apropiado y etiquetar para el tratamiento de una afección indicada, como se ha detallado adicionalmente anteriormente.
- Se apreciará que las composiciones terapéuticas de la invención pueden comprender, además de los agentes polinucleotídicos de micro-ARN, otros medicamentos conocidos para el tratamiento de la depresión, el estrés, la ansiedad, la privación del sueño, etc., tales como, pero sin limitarse a, inhibidores de la recaptación de serotonina (SSRI), inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina-noradrenalina (IRSN), antidepresivos noradrenérgicos y serotoninérgicos específicos (NaSSA), inhibidores selectivos de la recaptación de norepinefrina (noradrenalina) (NRI), inhibidores de la recaptación de norepinefrina, dopamina, potenciadores selectivos de la recaptación de serotonina, norepinefrina, desinhibidores de dopamina, antidepresivos tricíclicos (p. ej., imipramina), inhibidores de la monoaminoxidasa (MAO). Estos medicamentos pueden incluirse en el artículo de fabricación en un solo envase o en envases separados.
- Los autores de la presente invención han demostrado que la expresión anormalmente alta de miR-27 da como resultado la supresión de la MaoA (véase el Ejemplo 1, a continuación), la expresión anormalmente alta de miR-135 da como resultado la supresión de Slc6a4 (véase el Ejemplo 1, a continuación), la expresión anormalmente alta de miR-135, miR-335, miR-26, miR-181 o miR-182 da como resultado la supresión de Htr1a (véase el Ejemplo 1, a continuación), la expresión anormalmente alta de miR-19 da como resultado la supresión de Adrl (véase el Ejemplo 2, a continuación) y la supresión de CB1 (véase el Ejemplo 3B, más abajo), y que la expresión anormalmente alta de miR-15 da como resultado la supresión de Crh1R (véase el Ejemplo 4, a continuación) y la supresión de FKBP5 (véase Ejemplo 4B, a continuación).
- Por lo tanto, de acuerdo con una realización de la presente descripción, se proporciona un método de regulación de la expresión de un gen del transportador de serotonina (Slc6a4) en una célula glial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o la expresión de un microARN o un precursor del mismo, en donde el microARN se selecciona del grupo que consiste en miR-135 y miR-335.
- Como se emplea en la presente memoria, el término "transportador de serotonina (Slc6a4)" se refiere a la proteína transportadora de monoamina (también llamada SERT) implicada en la recaptación de serotonina de la hendidura sináptica. Un Slc6a4 ilustrativo se expone en NP_001036.1.
- De acuerdo con otra realización, se proporciona un método de regulación de la expresión de un gen del receptor inhibidor de serotonina 1a (Htr1a) en una célula glial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o la expresión de un microARN o un precursor del mismo en la célula glial, en donde el microARN se selecciona del grupo que consiste en miR-135, miR-335, miR-181, miR-182 y miR-26.
- Como se emplea en la presente memoria, el término "receptor inhibidor de serotonina 1a (Htr1a)" se refiere al receptor acoplado a proteína G que funciona como un autorreceptor en la neurona presináptica e inhibición mediada de la liberación de serotonina. Una Htr1a ilustrativa se expone en NP_000515.2.
- De acuerdo con otra realización, se proporciona un método para regular la expresión de un gen de la monoamino hidroxilasa (MaoA) en una célula glial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o la expresión de un miR-27 o un precursor del mismo.
- Como se emplea en la presente memoria, el término "monoamino hidroxilasa (MaoA)" se refiere a la enzima que degrada los neurotransmisores de amina, tales como la dopamina, la norepinefrina y la serotonina. Una MaoA ilustrativa se expone en NP_000231.1.
- De acuerdo con una realización de la presente descripción, se proporciona un método para regular la expresión de un gen de la triptófano hidroxilasa 2 (Tph2) en una célula glial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o la expresión de un micro-ARN o un precursor del mismo en la célula glial, en donde el microARN se selecciona del grupo que consiste en miR-181 y miR27.

Como se emplea en la presente memoria, el término "triptófano hidroxilasa 2 (Tph2)" se refiere a la enzima que cataliza la primera y limitante etapa en la biosíntesis de la serotonina. Una Tph2 ilustrativa se expone en NP_NP_775489.2.

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

10 Como se emplea en la presente memoria, el término "receptor beta adrenérgico 1 (Adrb1)" se refiere al receptor que media los efectos fisiológicos de la adrenalina y la noradrenalina. Un Adrb1 ilustrativo se expone en NP_000675.1.

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

15 Como se emplea en la presente memoria, el término "receptor beta 2 adrenérgico (Adrb2)" se refiere al receptor que está directamente asociado con el canal de calcio de tipo L clase C Ca(V)1.2. El Adrb2 se expone, p. ej., en NP_000015.1.

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

25 Como se emplea en la presente memoria, el término "CRH tipo 1" se refiere al receptor que se une a la hormona liberadora de corticotropina (CRH). El tipo 1 de CRH se expone, por ejemplo, en NP_001138618.1, NP_001138619.1, NP_001138620.1 y NP_004373.2.

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

35 De acuerdo con otra realización, el gen del receptor de glutamato comprende el receptor metabotrópico de glutamato de tipo 1 (Grm1), el receptor ionotrópico de glutamato de tipo kainato 3 (Grik3), el receptor metabotrópico de glutamato de tipo 5 (Grm5), el receptor ionotrópico de glutamato de tipo kainato 2 (Grik2), y el receptor metabotrópico de glutamato de tipo 7, como se ha descrito con más detalle anteriormente.

40 De acuerdo con otra realización, se proporciona un método de regulación de la expresión de un gen de la Molécula de Adhesión Celular del Síndrome de Down (Dscam) en una célula glial, comprendiendo el método la modulación de una actividad o la expresión de un miR-182 o un precursor del mismo.

Como se emplea en la presente memoria, el término "Molécula de Adhesión Celular del Síndrome de Down (Dscam)" se refiere a la molécula de adhesión celular que desempeña un papel en la auto-evitación neuronal. Dscam se expone, p. ej., en NP_001380.2.

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

50 Como se emplea en la presente memoria, el término "Molécula de adhesión celular L1 (L1cam)" se refiere a la molécula de adhesión de células neuronales. L1cam se expone, p. ej., en NP_000416.1, NP_001137435.1, NP_076493.1.

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

Como se emplea en la presente memoria, el término "proteína X asociada a Translina (Tsnax)" se refiere a la proteína que interactúa específicamente con translina. Tsnax se expone, p. ej., en NP_005990.1.

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

Como se emplea en la presente memoria, el término "receptor cannabinoide 1 (CB1)" se refiere al receptor de

membrana celular (también conocido como CNR1). CB1 se expone, por ejemplo, en NP_001153698.1, NP_001153730.1, NP_001153731.1, NP_057167.2, NP_149421.2.

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

10 Como se emplea en la presente memoria, el término "proteína 5 de unión a FK506 (FKBP5)" se refiere a la proteína que se une específicamente a los inmunosupresores FK506 y rapamicina. FKBP5 se expone, p. ej., en NP_001139247.1, NP_001139248.1, NP_001139249.1, NP_004108.1.

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

Como se emplea en la presente memoria, el término "sintaxina 1a (Stx1a)" se refiere a la proteína específica del sistema nervioso. Stx1a se expone, p. ej., en NP_001159375.1, NP_004594.1.

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

25 Como se emplea en la presente memoria, el término "quinasa regulada por suero/glucocorticoides (Sgk1)" se refiere a serina/treonina proteína quinasa. Sgk1 se expone, por ejemplo, en NP_001137148.1, NP_001137149.1, NP_001137150.1, NP_005618.2.

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

30 La regulación por disminución de la expresión génica de acuerdo con las presentes enseñanzas se lleva a cabo típicamente administrando o expresando en las células diana (p. ej., células gliales o células cardíacas) un polinucleótido de microARN (como se ha descrito con más detalle aquí anteriormente).

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

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

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

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

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

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

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

Alternativamente, de acuerdo con otra realización de la presente descripción, la expresión génica regulada por incremento se ve afectada por la administración o la expresión en las células diana (p. ej., células gliales o células cardíacas) de un agente capaz de la regulación por disminución de una expresión de un microARN.

60 La regulación por disminución de los microARN se puede efectuar a el nivel genómico y/o de transcripción utilizando una variedad de moléculas que interfieren en la transcripción y/o la traducción (p. ej., agentes silenciadores de ARN, Ribozima, ADNzima y moléculas antisentido).

Los métodos para la regulación por disminución de la expresión del microARN son conocidos en la técnica.

Los agentes de ácido nucleico que regulan por disminución la actividad de miR incluyen, pero no se limitan a, un mimético diana, un gen resistente a micro-ARN y un inhibidor de miARN.

El mimético diana o diana resistente a micro-ARN es esencialmente complementario al microARN siempre que se permitan uno o más de los siguientes emparejamientos erróneos:

- (a) un emparejamiento erróneo entre el nucleótido en el extremo 5' del microARN y la secuencia de nucleótidos correspondiente en el mimético diana o la diana resistente al micro-ARN;
- (b) un emparejamiento erróneo entre cualquiera de los nucleótidos en la posición 1 a la posición 9 del microARN y la secuencia de nucleótidos correspondiente en el mimético diana o diana resistente al micro-ARN; o
- (c) tres emparejamientos erróneos entre cualquiera de los nucleótidos en la posición 12 y la posición 21 del microARN y la secuencia de nucleótidos correspondiente en el mimético diana o la diana resistente al micro-ARN, siempre que no haya más de dos emparejamientos erróneos consecutivos.

El ARN mimético diana es esencialmente similar al ARN diana modificado para hacerlo resistente a la escisión inducida por miARN, p. ej. modificando su secuencia de modo que se introduzca una variación en el nucleótido de la secuencia diana complementaria a los nucleótidos 10 u 11 del miARN, dando como resultado un emparejamiento erróneo.

Alternativamente, se puede implementar una diana resistente a microARN. Por lo tanto, se puede introducir una mutación silenciosa en el sitio de unión de microARN del gen diana, de modo que las secuencias de ADN y ARN resultantes se cambien de una manera que se evite la unión del microARN, pero la secuencia de aminoácidos de la proteína no se modifique. Por lo tanto, se puede sintetizar una nueva secuencia en lugar del sitio de unión existente, en el que se cambia la secuencia de ADN, lo que da como resultado la carencia de unión del miARN a su diana.

De acuerdo con una realización específica, el mimético diana o la diana resistente a micro-ARN están unidos al promotor asociado naturalmente con el pre-miARN que reconoce el gen diana y se introduce en la célula vegetal. De esta manera, el mimético diana de miARN o ARN diana resistente al micro-ARN se expresarán en las mismas circunstancias que el miARN y el mimético diana o ARN diana resistente al micro-ARN sustituirán al mimético no diana/ARN diana resistente al microARN degradado por la escisión inducida por miARN.

Los alelos de miARN no funcionales o los genes diana resistentes a miARN también se pueden introducir por recombinación homóloga para sustituir los alelos que codifican el miARN o los genes diana sensibles a miARN.

La expresión recombinante se efectúa clonando el ácido nucleico de interés (p. ej., miARN, gen diana, agente silenciador, etc.) en una construcción de expresión de ácido nucleico bajo la expresión de un promotor vegetal.

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

Los inhibidores de miARN pueden ponerse en contacto con las células mediante técnicas de transfección transitoria. Los inhibidores de miARN están disponibles comercialmente de compañías tales como Applied Biosystems.

Alternativamente, los inhibidores de miARN pueden ser parte de un vector de expresión, como se ha descrito aquí anteriormente. En este caso, las células pueden transfectarse de forma transitoria o estable con el vector.

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

De acuerdo con una realización, la regulación por disminución de la expresión de un microARN se efectúa mediante el uso de una secuencia de ácido nucleico que se une específicamente y regula por disminución la expresión del microARN. Una secuencia de ácido nucleico ilustrativa que se puede utilizar de acuerdo con la presente invención se puede adquirir a cualquier fabricante, como por ejemplo, a Genecopoeia (miArrest, inhibidores basados en vectores de microARN).

Por lo tanto, De acuerdo con otra realización, se proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de ácido nucleico para la regulación por disminución de una expresión de miR-181, miR-182, miR-26,

miR-27, miR-135, miR-335, miR-15 y miR-19 o un precursor de los mismos.

Los polinucleótidos ilustrativos que se pueden utilizar de acuerdo con la presente descripción para la regulación por disminución de la expresión de miR-181 incluyen, pero no se limitan a, los establecidos en SEQ ID NO: 134-137 y SEQ ID NO: 154-157.

Los polinucleótidos ilustrativos que se pueden utilizar de acuerdo con la presente descripción para la regulación por disminución de la expresión de miR-182 incluyen, pero no se limitan a, los establecidos en SEQ ID NO: 138-141 y SEQ ID NO: 147.

Los polinucleótidos ilustrativos que se pueden utilizar de acuerdo con la presente descripción para la regulación por disminución de la expresión de miR-26 incluyen, pero no se limitan a, los establecidos en SEQ ID NO: 126-129 y SEQ ID NO: 145-146.

Los polinucleótidos ilustrativos que se pueden utilizar de acuerdo con la presente descripción para la regulación por disminución de la expresión de miR-27 incluyen, pero no se limitan a, los establecidos en SEQ ID NO: 130-133 y SEQ ID NO: 152-153.

Los polinucleótidos ilustrativos que se pueden utilizar de acuerdo con la presente descripción para la regulación por disminución de la expresión de miR-135 incluyen, pero no se limitan a, los establecidos en SEQ ID NO: 110-113 y SEQ ID NO: 142-143.

Los polinucleótidos ilustrativos que se pueden utilizar de acuerdo con la presente descripción para la regulación por disminución de la expresión de miR-335 incluyen, pero no se limitan a, los establecidos en SEQ ID NO: 114-117 y SEQ ID NO: 144.

Los polinucleótidos ilustrativos que se pueden utilizar de acuerdo con la presente descripción para la regulación por disminución de la expresión de miR-15 incluyen, pero no se limitan a, los establecidos en SEQ ID NO: 118-121 y SEQ ID NO: 150-151.

Los polinucleótidos ilustrativos que se pueden utilizar de acuerdo con la presente descripción para la regulación por disminución de la expresión de miR-19 incluyen, pero no se limitan a, los establecidos en SEQ ID NO: 122-125 y SEQ ID NO: 148-149.

Dichas secuencias de ácido nucleico pueden estar comprendidas adicionalmente en un vector de expresión como se ha descrito con más detalle aquí anteriormente.

La presente invención contempla adicionalmente evaluar la expresión del gen diana (p. ej., transcrito o polipéptido) después de la regulación por disminución o por aumento del nivel de microARN en la célula (p. ej., célula glial o célula cardíaca).

Por lo tanto, la presencia y/o el nivel de una secuencia de ácido nucleico (p. ej., transcrito) de un gen diana (p. ej., Slc6a4, Htr1a, MaoA, Adrb1, Adrb2, _CRH tipo 1, CB1, FKBP5, Tph2, Grm1, Grik3, Grm5, Grik2, Grm2, Grc2, Dscam, L1cam, Tsnax, Sgk1 y/o Stx1a) se puede determinar utilizando un polinucleótido aislado (p. ej., una sonda polinucleotídica, una sonda/cebador oligonucleotídicos) capaz de hibridar con una secuencia de ácido nucleico del gen diana (p. ej., Slc6a4 como se expone, por ejemplo, en NM_001045.4 o una porción del mismo; Htr1a como se expone, p. ej., en NM_000524.3 o una porción del mismo; MaoA, como se expone, p. ej., en NM_000240.3 o NM_001270458.1 o una porción del mismo; Adrb1, como se expone, p. ej., en NM_000684.2 o una porción del mismo; Adrb2 como se expone en, por ejemplo, NM_000024.5 o una porción del mismo; receptor de tipo 1 de CRH como se expone, p. ej., en NM_001145146.1, NM_001145147.1 o una porción del mismo; CB1, como se indica, p. ej., en NM_001160226.1, NM_033181.3 o una porción del mismo; FKBP5 como se expone, p. ej., en NM_001145775.1, NM_001145777.1 o una porción del mismo; Tph2 como se expone, p. ej., en NM_173353.3 o una porción del mismo; Grm1 como se expone, p. ej., en NM_000838.3, NM_001114329.1 o una porción del mismo; Grik3 como se expone, p. ej., en NM_000831.3 o una porción del mismo; Grm5 como se expone, p. ej., en NM_000842.3, NM_001143831.2 o una porción del mismo; Grik2 como se expone, p. ej., en NM_001166247.1, NM_021956.4 o una porción del mismo; Grm7 como se expone, p. ej., en NM_000844.3, NM_181874.2 o una porción del mismo; Gria2 como se expone, p. ej., en NM_000826.3, NM_001083619.1 o una porción del mismo; Dscam como se expone, p. ej., en NM_0011389.3 o una porción del mismo; L1cam como se expone, p. ej., en NM_000425.3, NM_001143963.1, NM_024003.2 o una porción del mismo; Tsnax como se expone, p. ej., en NM_005999.2 o una porción del mismo; Sgk1 como se expone, p. ej., en NM_001143676.1, NM_001143677.1, NM_001143678.1 o una porción del mismo y/o Stx1a como se expone, p. ej., en NM_001165903.1, NM_004603.3 o una porción del mismo). Tal polinucleótido puede ser de cualquier tamaño, tal como un polinucleótido corto (p. ej., de 15-200 bases), y un polinucleótido intermedio (p. ej., 200-2000 bases) o un polinucleótido largo mayor de 2000 bases.

La sonda polinucleotídica aislada utilizada por la presente descripción puede ser cualquier molécula de ARN marcada directa o indirectamente (p. ej., oligonucleótido de ARN, molécula de ARN transcrita *in vitro*), molécula de ADN (p. ej., oligonucleótido, molécula de ADNc, molécula genómica) y/o un análogo de la misma [p. ej., ácido peptidonucleico (PNA)] que es específico del transcrito de ARN del gen diana de la presente descripción.

Los oligonucleótidos diseñados de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención se pueden generar de acuerdo con cualquier método de síntesis de oligonucleótidos conocido en la técnica, como se ha descrito en detalle anteriormente.

El oligonucleótido de la presente descripción tiene al menos 17, al menos 18, al menos 19, al menos 20, al menos 22, al menos 25, al menos 30 o al menos 40, bases hibridables específicamente con las alteraciones de secuencia descritas anteriormente en la presente memoria.

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

Preferiblemente, los oligonucleótidos empleados son aquellos modificados en la cadena principal, los enlaces internucleosídicos o las bases, como se ha descrito ampliamente en la presente memoria anteriormente.

El polinucleótido aislado utilizado en la presente descripción se puede marcar directa o indirectamente empleando una etiqueta o una molécula marcadora. Tales marcas pueden ser, por ejemplo, moléculas fluorescentes (p. ej., fluoresceína o Rojo Texas), molécula radiactiva (p. ej., ^{32}P - γ -ATP o ^{32}P - α -ATP) y sustratos cromogénicos [p. ej., Fast Red, BCIP/INT, disponible de (ABCam, Cambridge, MA)]. El marcaje directo se puede lograr conjugando covalentemente una molécula marcada con el polinucleótido (p. ej., empleando síntesis en fase sólida) o mediante incorporación a través de polimerización (p. ej., empleando una reacción de transcripción *in vitro* o marcaje de cebado al azar). El marcaje indirecto se puede lograr conjugando covalentemente o incorporando al polinucleótido una molécula etiqueta no marcada (p. ej., digoxigenina o biotina) y con posterioridad sometiendo el polinucleótido a una molécula marcada (p. ej., anticuerpo anti-digoxigenina o estreptavidina) capaz de reconocer específicamente la etiqueta no marcada.

Los polinucleótidos descritos anteriormente se pueden emplear en una variedad de métodos de detección de ARN, tal como análisis de transferencia Northern, PCR de transcripción inversa (RT-PCR) [p. ej., una RT-PCR semicuantitativa, RT-PCR cuantitativa utilizando, p. ej., Light Cycler™ (Roche)], hibridación de ARN *in situ* (RNA-ISH), tinción de RT-PCR *in situ* [p. ej., como describen Nuovo GJ, et al. 1993, Intracellular localization of polymerase chain reaction (PCR)-amplified hepatitis C cDNA. Am J Surg Pathol. 17: 683-90, and Komminoth P, et al. 1994, Evaluation of methods for hepatitis C virus detection in archival liver biopsies. Comparison of histology, immunohistochemistry, in situ hybridization, reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) and in situ RT-PCR. Pathol Res Pract., 190: 1017-25] y análisis de micromatrices de oligonucleótidos [p. ej., utilizando la micromatriz de Affymetrix (Affymetrix®, Santa Clara, CA)].

La presencia y/o nivel de la secuencia de aminoácidos (p. ej., proteína) del gen diana (p. ej., Slc6a4, Htr1a, MaoA, Adrb1, Adrb2, receptor de CRH tipo 1, CB1, FKBP5, Tph2, Grm1, Grik3, Grm5, Grik2, Grm2, Gria2, Dscam, L1cam, Tsnax, Sgk1 y/o Stx1a) se puede determinar utilizando, por ejemplo, un anticuerpo específico a través de la formación de un inmunocomplejo [es decir, un complejo formado entre el antígeno del gen diana (una secuencia de aminoácidos) presente en la muestra biológica y el anticuerpo específico].

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

El término "anticuerpo", como se emplea en esta descripción, incluye moléculas intactas, así como también fragmentos funcionales de las mismas, tales como Fab, F(ab')₂, Fv o moléculas de dominio único tales como VH y VL para un epítipo de un antígeno. Estos fragmentos de anticuerpos funcionales se definen de la siguiente manera: (1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, se puede producir por digestión de un anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada; (2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo que se puede obtener tratando el anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para producir una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo; (3) (Fab')₂, el fragmento del anticuerpo que se puede obtener tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin reducción posterior; F(ab')₂ es un dímero de dos fragmentos Fab' unidos por dos enlaces disulfuro; (4) Fv, definido como un fragmento modificado genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresada como dos cadenas; (5) Anticuerpo de cadena sencilla ("SCA"), una molécula diseñada genéticamente que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unidas por un conector polipeptídico adecuado tal como una molécula de cadena única genéticamente fusionada; y (6) los

anticuerpos de dominio único están compuestos de un solo dominio VH o VL que muestran una afinidad suficiente por el antígeno.

5 Los métodos para producir anticuerpos policlonales y monoclonales, así como sus fragmentos, son bien conocidos en la técnica (Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988, incorporada a la presente como referencia).

10 Los fragmentos de anticuerpos de acuerdo con la presente descripción se pueden preparar mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo o mediante expresión en *E. coli* o células de mamíferos (p. ej., cultivo de células de Ovario de hámster chino u otros sistemas de expresión de proteínas) de ADN que codifica el fragmento. Los fragmentos de anticuerpos se pueden obtener por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos completos mediante métodos convencionales. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos se pueden producir por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para proporcionar un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento puede ser escindido adicionalmente empleando un agente reductor de tiol, y opcionalmente un grupo bloqueador para los grupos sulfhidrilo que resulta de la escisión de enlaces disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' 3.5S. Alternativamente, una escisión enzimática en la que se utiliza pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos son descritos, por ejemplo, por Goldenberg, Patentes de Estados Unidos Núm. 4.036.945 y 4.331.647 y las referencias contenidas en las mismas, cuyas patentes se incorporan en la presente memoria como referencia en su totalidad. Véase también Porter, R. R. [*Biochem. J.* 73: 119-126 (1959)].

20 También se pueden utilizar otros métodos de escisión de anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas para formar fragmentos de cadena pesada-ligera monovalentes, escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno que sea reconocido por el anticuerpo intacto.

25 Los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas VH y VL. Esta asociación puede ser no covalente, como describen Inbar et al. [*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 69: 2659-62 (1972)]. Alternativamente, las cadenas variables se pueden unir mediante un enlace disulfuro intermolecular o se pueden entrecruzar mediante productos químicos tales como glutaraldehído. Preferiblemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas VH y VL conectadas por un conector peptídico. Estas proteínas de unión a antígeno de una sola cadena (scFv) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL conectados por un oligonucleótido. El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que posteriormente se introduce en una célula anfitriona tal como *E. coli*. Las células anfitrionas recombinantes sintetizan una única cadena polipeptídica con un péptido conector que une los dos dominios V. Los métodos para producir scFvs son descritos, p. ej., por Whitlow y Filpula, *Methods* 2: 97-105 (1991); Bird et al., *Science* 242: 423-426 (1988); Pack et al., *Bio/Technology* 11:1271-77 (1993); y la Patente de Estados Unidos Núm. 4.946.778, que se incorpora en la presente memoria como referencia en su totalidad.

30

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

40

45 Los anticuerpos también se pueden producir utilizando diversos mecanismos conocidos en la técnica, incluidas las bibliotecas de presentación de fagos [Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)]. Las técnicas de Cole et al. y Boerner et al. también están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, pág. 77 (1985) y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991)]. De manera similar, los anticuerpos humanos se pueden producir mediante la introducción de loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógenos se han inactivado parcial o completamente. Tras la sensibilización, se observa la producción de anticuerpos humanos, que se asemeja mucho a la observada en los seres humanos en todos los aspectos, incluido el reordenamiento de genes, el ensamblaje y el repertorio de anticuerpos. Este enfoque se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Núm. 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y en las siguientes publicaciones científicas: Marks et al., *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg et al., *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368 812-13 (1994); Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13, 65-93 (1995).

50

55

60 Los anticuerpos ilustrativos que se pueden utilizar de acuerdo con la presente descripción incluyen, p. ej., anticuerpo anti-Slc6a4 disponible, p. ej. de Abnova Corporation, Abgent y MBL International; anticuerpo anti-Htr1a disponible, p. ej., de Novus Biologicals, Acris Antibodies GmbH y Abnova Corporation; anticuerpo anti-MaoA disponible, p. ej., de Abnova Corporation, Proteintech Group, Inc. y Abgent; anticuerpo anti-Adrb1 disponible, p. ej., de Biorbyt, Abgent y anticuerpos en línea; anticuerpo anti-Adrb2 disponible, p. ej., de Tocris Bioscience, Abnova Corporation y anticuerpos en línea; anticuerpo anti-CRH tipo 1 disponible, p. ej., de MyBioSource.com, Abcam y Novus Biologicals;

anticuerpo anti-CBI disponible, p. ej., de Santa Cruz Biotechnology, Inc. y Epitomics, Inc.; anticuerpo anti-FKBP5 disponible, p. ej., de BD Biosciences y Abnova Corporation; anticuerpo anti-Tph2 disponible p. ej., de Novus Biologicals y Acris Antibodies GmbH; anticuerpo anti-Grm1 disponible, p. ej., de Novus Biologicals y Biorbyt; anticuerpo anti-Grik3 disponible, p. ej., de Acris Antibodies GmbH y Atlas Antibodies; anticuerpo anti-Grm5 disponible, p. ej., de Biorbyt y Acris Antibodies GmbH; anticuerpo anti-Grik2 disponible, p. ej., de Proteintech Group, Inc., Aviva Systems Biology y Abgent; anticuerpo anti-Grm7 disponible, p. ej., de Acris Antibodies GmbH y anticuerpos en línea; anticuerpo anti-Gria2 disponible, p. ej., de Proteintech Group, Inc. y Abnova Corporation; anticuerpo anti-Dscam disponible, p. ej., de Novus Biologicals y R&D Systems; anticuerpo anti-Llcam disponible, p. ej., de GeneTex, Novus Biologicals y Acris Antibodies GmbH; anticuerpo anti-Tsnax disponible, p. ej., de BD Biosciences y GenWay Biotech, Inc.; anticuerpo anti-Sgkl disponible, p. ej., de Epitomics, Inc. y Acris Antibodies GmbH; y/o anticuerpo anti-Stxla disponible, p. ej. de MBL International y Spring Bioscience.

Se pueden utilizar varios métodos para detectar la formación del inmunocomplejo de la presente descripción y los expertos en la técnica son capaces de determinar qué método es adecuado para cada inmunocomplejo y/o el tipo de células utilizadas para el diagnóstico.

El anticuerpo específico (p. ej., anticuerpo anti-Slc6a4; anticuerpo anti-Htrla; anticuerpo anti-MaoA; anticuerpo anti-Adrb1; anticuerpo anti-Adrb2; anticuerpo anti-receptor de CRH tipo 1; anticuerpo anti-CBI; anticuerpo anti-FKBP5; anticuerpo anti-Tph2; anticuerpo anti-Grm1; anticuerpo anti-Grik3; anticuerpo anti-Grm5; anticuerpo anti-Grik2; anticuerpo anti-Grm7; anticuerpo anti-Gria2; anticuerpo anti-Dscam; anticuerpo anti-Llcam; anticuerpo anti-Tsnax; anticuerpo anti-Sgkl y/o anticuerpo anti-Stxla utilizados en el inmunocomplejo de la presente descripción se pueden marcar empleando métodos conocidos en la técnica. Se apreciará que los anticuerpos marcados pueden ser anticuerpos primarios (es decir, que se unen al antígeno específico, por ejemplo, un antígeno específico del gen diana) o anticuerpos secundarios (p. ej., anticuerpos anti-conejo de cabra marcados, anticuerpo anti-humano de ratón marcado) que se unen a los anticuerpos primarios. El anticuerpo se puede conjugar directamente con una etiqueta o se puede conjugar con una enzima.

Los anticuerpos de la presente descripción se pueden marcar de forma fluorescente (utilizando un colorante fluorescente conjugado con un anticuerpo), radiomarcarse (utilizando anticuerpos radiomarcados, p. ej., ¹²⁵I), o conjugar con una enzima (p. ej., peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) y utilizar junto con un sustrato cromogénico para producir una reacción colorimétrica. Los sustratos cromogénicos utilizados por los anticuerpos conjugados con enzimas de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, AEC, Fast red, sustrato ELF-97 [2-(5'-cloro-2-fosforiloxifenil)-6-cloro-4(3H)-quinazolinona], p-nitrofenilfosfato (PNPP), difosfato de fenoltaleína y ELF 39-fosfato, BCIP/INT, Vector Red (VR), fosfato salmón y magenta (Avivi C., et al., 1994, J Histochem. Cytochem. 1994; 42: 551-4) para la enzima fosfatasa alcalina y Nova Red, diaminobenzidina (DAB), Vector (R) sustrato SG, sustrato quimioluminiscente basado en luminol para la enzima peroxidasa. Estos sustratos enzimáticos están disponibles comercialmente de Sigma (St. Louis, MO, EE. UU.), Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, EE. UU.), Vector Laboratories Inc. (Burlingame, CA, EE. UU.), Zymed Laboratories Inc. (San Francisco, CA, USA), Dako Cytomation (Dinamarca).

La detección del inmunocomplejo en una muestra biológica, tal como una muestra de sangre o suero, que puede contener un polipéptido del gen diana soluble (p. ej., secretado, excretado) se puede realizar utilizando análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), transferencia Western y radioinmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación (IP) o por un enfoque basado en el peso molecular.

Para la transferencia Western, las proteínas se extraen de una muestra de células y se someten a electroforesis (p. ej., SDS-PAGE) y se transfieren a una membrana (p. ej., nailon o PVDF). Después, la membrana interactúa con un anticuerpo específico (p. ej., anticuerpo anti-Slc6a4; anticuerpo anti-Htrla; anticuerpo anti-MaoA; anticuerpo anti-Adrb1; anticuerpo anti-Adrb2; anticuerpo anti-CRH tipo 1; anticuerpo anti-CB1; anticuerpo anti-FKBP5; anticuerpo anti-Tph2; anticuerpo anti-Grm1; anticuerpo anti-Grik3; anticuerpo anti-Grm5; anticuerpo anti-Grik2; anticuerpo anti-Grm7; anticuerpo anti-Gria2; anticuerpo anti-Dscam; anticuerpo anti-Llcam; anticuerpo anti-Tsnax; anticuerpo anti-Sgkl y/o anticuerpo anti-Stxla) que puede ser directamente marcado o sometido adicionalmente a un anticuerpo secundario marcado. La detección puede ser por autorradiografía, reacción colorimétrica o quimioluminiscencia. Este método permite la cuantificación de una cantidad de sustrato y la determinación de su identidad por una posición relativa en la membrana que es indicativa de una distancia de migración en el gel de acrilamida durante la electroforesis.

En caso de que la concentración del antígeno en la muestra biológica sea baja, la detección del antígeno (secuencia de aminoácidos del gen diana) se puede realizar mediante inmunoprecipitación (IP). Para el análisis de inmunoprecipitación, el anticuerpo específico (p. ej., anticuerpo anti-Slc6a4; anticuerpo anti-Htrla; anticuerpo anti-MaoA; anticuerpo anti-Adrb1; anticuerpo anti-Adrb2; anticuerpo anti-CRH tipo 1; anticuerpo anti-CB 1; anti-FKBP5 anticuerpo; anticuerpo anti-Tph2; anticuerpo anti-Grm1; anticuerpo anti-Grik3; anticuerpo anti-Grm5; anticuerpo anti-Grik2; anticuerpo anti-Grm7; anticuerpo anti-Gria2; anticuerpo anti-Dscam; anticuerpo anti-Llcam; anti-Tsnax

anticuerpo; anticuerpo anti-Sgkl y/o anticuerpo anti-Stxla) puede interactuar directamente con una muestra (p. ej., un producto lisado celular) que incluye el polipéptido del gen diana y el complejo formado se puede detectar adicionalmente empleando un anticuerpo secundario conjugado con las esferas (p. ej., si el anticuerpo específico es un anticuerpo monoclonal de ratón, el anticuerpo secundario puede ser un anticuerpo anti-ratón conjugado, p. ej., con esferas de Sefarosa). Las esferas se pueden precipitar después por centrifugación, después de lo cual las proteínas precipitadas (p. ej., el polipéptido del gen diana y los anticuerpos específicos) se pueden separar de las esferas (p. ej., empleando desnaturalización a 95°C) y además se pueden someter a análisis de transferencia Western empleando anticuerpos. Alternativamente, el anticuerpo específico y el anticuerpo secundario conjugado con las esferas se pueden añadir a la muestra biológica que contiene el antígeno (polipéptido del gen diana) para formar así un inmunocomplejo. Alternativamente, si el polipéptido del gen diana es una proteína altamente glicosilada, también se puede precipitar empleando un sustrato capaz de unirse a los polipéptidos glicosilados tales como Concanavalina A (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Suecia) que también se puede conjugar con las esferas, seguido de anticuerpos específicos del análisis de transferencia Western como se ha descrito anteriormente.

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

La presencia y/o el nivel del polipéptido del gen diana también se puede determinar utilizando ELISA. Brevemente, una muestra que contiene el antígeno del gen diana se fija a una superficie tal como un pocillo de una placa de microtitulación. Un anticuerpo específico para el antígeno (p. ej., anticuerpo anti-Slc6a4; anticuerpo anti-Htrla; anticuerpo anti-MaoA; anticuerpo anti-Adrb1; anticuerpo anti-Adrb2; anticuerpo anti-receptor de CRH tipo 1; anticuerpo anti-CBl; anticuerpo anti-FKBP5; anticuerpo anti-Tph2; anticuerpo anti-Grm1; anticuerpo anti-Grik3; anticuerpo anti-Grm5; anticuerpo anti-Grik2; anticuerpo anti-Grm7; anticuerpo anti-Gria2; anticuerpo anti-Dscam; anticuerpo anti-L1cam; anticuerpo anti-Tsnax; anticuerpo anti-Schl y/o anticuerpo anti-Stxla) acoplado a una enzima se aplica y se deja que se una al antígeno. La presencia del anticuerpo se detecta y cuantifica después mediante una reacción colorimétrica que emplea la enzima acoplada al anticuerpo. Las enzimas comúnmente empleadas en este método incluyen la peroxidasa de rábano picante y la fosfatasa alcalina. Si está bien calibrada y dentro del rango lineal de respuesta, la cantidad de sustrato presente en la muestra es proporcional a la cantidad de color producida. Generalmente se emplea un patrón de sustrato para mejorar la precisión cuantitativa.

La presencia y/o nivel de un polipéptido del gen diana también se puede determinar utilizando un radioinmunoensayo (RIA). En una versión, este método implica la precipitación del antígeno deseado (polipéptido del gen diana) con un anticuerpo específico y una proteína de unión al anticuerpo radiomarcado (p. ej., proteína A marcada con I^{125}) inmovilizada sobre un portador precipitable tal como esferas de agarosa. El número de recuentos en el sedimento precipitado es proporcional a la cantidad de antígeno.

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

La presencia y/o nivel de un polipéptido del gen diana también se puede determinar utilizando un enfoque basado en el peso molecular. Dado que el inmunocomplejo exhibe un peso molecular más alto que sus componentes, también se pueden emplear métodos capaces de detectar dicho cambio en el peso molecular. Por ejemplo, el inmunocomplejo se puede detectar mediante un ensayo de retardo en gel. En resumen, un gel de acrilamida no desnaturizante se carga con muestras. Un cambio en el tamaño (peso molecular) del producto proteico en comparación con sus componentes es indicativo de la presencia de un inmunocomplejo. Este cambio a un peso molecular más alto puede verse utilizando una tinción de proteínas no específica como la tinción de plata o la tinción azul de Commassie.

La detección in situ del polipéptido del gen diana en una muestra biológica tal como una sección de tejido (p. ej., incluida en parafina o criosección) se puede realizar utilizando métodos de tinción inmunológica que detectan la unión de anticuerpos en las células in situ. Los ejemplos de procedimientos de tinción inmunológica incluyen, pero no se limitan a, inmunohistoquímica marcada con fluorescencia (utilizando un colorante fluorescente conjugado con un anticuerpo), inmunohistoquímica radiomarcada (utilizando anticuerpos radiomarcados, p. ej., I^{125}), e inmunocitoquímica [utilizando una enzima (p. ej., peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) y un sustrato cromogénico para producir una reacción colorimétrica]. Se apreciará que las enzimas conjugadas con anticuerpos pueden utilizar diversos sustratos cromogénicos como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

Preferiblemente, la tinción inmunológica usada por la presente descripción es inmunohistoquímica y/o inmunocitoquímica.

La tinción inmunológica es seguida preferiblemente por una contratinción de las células utilizando un tinte, que se une a los compartimentos celulares no teñidos. Por ejemplo, si el anticuerpo marcado se une a los antígenos presentes en el citoplasma celular, una tinción nuclear (p. ej., tinción de Hematoxilina-Eosina) es una contratinción apropiada.

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

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

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

15 De acuerdo con una realización, el método comprende medir una expresión del gen de MaoA después de la regulación por incremento de miR-27.

20 De acuerdo con una realización, el método comprende medir una expresión del gen de Adrb1 después de la regulación por incremento de miR-19.

De acuerdo con una realización, el método comprende medir una expresión del gen de CB1 después de la regulación por incremento de CB1.

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

De acuerdo con una realización, el método comprende medir una expresión del gen de FKBP5 después de la regulación por incremento de miR-15.

30 Los autores de la presente invención se han dado cuenta además de que mR135 está regulado por incremento en sujetos que tienen una afección médica asociada con la serotonina (descrita anteriormente).

35 Por lo tanto, se proporciona un método para diagnosticar una afección médica relacionada con la serotonina en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método medir un nivel de expresión de un miR-135 en una sangre del sujeto, en donde un alto nivel de expresión del miR-135 en comparación con el de una muestra de sangre de un sujeto sano es indicativo de la afección médica asociada a la serotonina.

40 Los métodos para analizar miR en muestras de sangre son bien conocidos en la técnica y se describen a continuación.

45 El diagnóstico se puede evaluar y establecer adicionalmente utilizando los métodos del patrón Oro. Típicamente, al menos uno de los antecedentes médicos completos del paciente, la evaluación física y la evaluación completa de los síntomas ayudan a determinar la causa de la depresión. Los cuestionarios normalizados pueden ser útiles, tales como la Escala de Evaluación de Hamilton para la Depresión y el Inventario de Depresión de Beck.

Los autores de la presente invención han demostrado además que los niveles plasmáticos de miR-135a disminuyen en los sujetos tratados con un fármaco antidepresivo, como la fluoxetina (un antidepresivo de la clase SSRI), mientras que los niveles de miR-135a en el cerebro aumentan en estos mismos sujetos. (Ver Figuras 3E-J).

50 Por lo tanto, De acuerdo con otra realización de la presente descripción, se proporciona un método para controlar el tratamiento de un fármaco antidepresivo, comprendiendo el método: (a) tratar a un sujeto que lo necesite con un fármaco antidepresivo; y (b) medir un nivel de expresión de un miR-135 en la sangre del sujeto antes y después del tratamiento, en donde un nivel de expresión más bajo del miR-135 después del tratamiento con el medicamento antidepresivo en comparación con el nivel de expresión del miR-135 antes del tratamiento con el fármaco antidepresivo es indicativo de un tratamiento eficaz.

60 Como se emplea en la presente memoria, el término "fármaco antidepresivo" se refiere a cualquier medicamento utilizado para aliviar los trastornos del estado de ánimo, tal como la depresión mayor y la distimia, y los trastornos de ansiedad, tales como el trastorno de ansiedad social. Los fármacos antidepresivos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRI, tales como Citalopram, Escitalopram, Fluoxetina, Fluvoxamina, Paroxetina y Sertralina); Inhibidores de la recaptación de serotonina y norepinefrina (SNRI, tales como Desvenlafaxina, Duloxetina, Milnacipran y Venlafaxina); Antidepresivos noradrenérgicos y serotoninérgicos específicos (tales como Mianserina y Mirtazapina); Inhibidores de la recaptación de noradrenalina (noradrenalina) (NRI, tales como Atomoxetina, Mazindol, Reboxetina and Viloxazina); Inhibidores de la recaptación

de Norepinefrina-dopamina (tales como Bupropion); Mejoradores selectivos de la recaptación de serotonina (tales como Tianeptina); Desinhibidores de norepinefrina-dopamina (NDDI tales como Agomelatina); Antidepresivos tricíclicos (incluidos Antidepresivos tricíclicos de amina terciaria y Antidepresivos tricíclicos de amina secundaria); e Inhibidores de monoaminoxidasa (MAOI).

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

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

Como se emplea en la presente memoria, el término "muestra de sangre" se refiere a sangre completa de nueva aportación, sangre completa fraccionada y plasma sanguíneo. La muestra de sangre se obtiene típicamente del sujeto después del tratamiento con un medicamento antidepresivo, sin embargo, también se puede obtener una muestra de sangre del sujeto antes del tratamiento para una comparación adicional de los niveles de miR-135.

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

20 De acuerdo con otra realización, se proporciona un método para controlar una afección psiquiátrica en un sujeto que lo necesite, comprendiendo el método medir un nivel de expresión de un miR-135 en una sangre del sujeto, en donde un alto nivel de expresión del miR-135 en comparación con un sujeto sano es indicativo de el trastorno psiquiátrico.

25 De acuerdo con otra realización, el trastorno psiquiátrico comprende depresión, ansiedad, estrés, fatiga, deterioro de la función cognitiva, ataque de pánico, comportamiento compulsivo, adicción, fobia social, trastorno del sueño y trastorno relacionado con la alimentación.

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

30 La medición de un nivel de expresión de un miR-135 se puede llevar a cabo mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica, tal como por ejemplo, mediante análisis Northern, ensayo de protección de ARNasa y PCR (p. ej., PCR en tiempo real).

35 El seguimiento del tratamiento también se puede efectuar evaluando el bienestar del paciente, y adicionalmente o alternativamente, sometiendo al sujeto a pruebas de comportamiento, MRI o cualquier otro método conocido por un experto en la técnica.

40 Se espera que durante la vigencia de una patente que está madurando a partir de esta solicitud, se desarrollen muchos inhibidores relevantes de los miARN o, alternativamente, se desarrollen modificaciones de miARN y se pretende que el alcance del término microARN incluya todas estas nuevas tecnologías *a priori*.

Como se emplea en la presente memoria, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

45 Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "que incluye pero no se limita a".

El término "que consiste" significa "que incluye y se limita a".

50 El término "que consiste esencialmente en" significa que la composición, el método o la estructura pueden incluir ingredientes, etapas y/o partes adicionales, pero solo si los ingredientes, las etapas y/o las partes adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición, los método o la estructura reivindicados.

55 Como se emplea en la presente memoria, la forma singular "un", "uno", "una" "el" y "la" incluye las referencias plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

60 A lo largo de esta solicitud, varias realizaciones de esta invención se pueden presentar en un formato de rango. Se debe entender que la descripción en formato de rango es meramente por conveniencia y brevedad y no se debe interpretar como una limitación inflexible en el alcance de la invención. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un rango ha revelado específicamente todos los subintervalos posibles, así como los valores numéricos individuales dentro de ese rango. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un rango tal como de 1 a 6 ha revelado específicamente subintervalos tales como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6,

de 3 a 6, etc., así como a números individuales dentro de ese rango, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del rango.

Quando se indica un rango numérico en la presente memoria, se pretende que incluya cualquier número citado (fraccionado o entero) dentro del rango indicado. Las frases "que varía/varía entre" un primer número indicado y un segundo número indicado y "que varía/varía de" un primer número indicado "a" un segundo número indicado se usan en la presente memoria indistintamente y se pretende que incluyan el primer y segundo número indicado y todos los números fraccionados y enteros entre ellos.

Como se emplea en la presente memoria, el término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea dada, incluidos, pero sin limitarse a, esas maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos o desarrollados fácilmente a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos de los profesionales de las técnicas químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

Se aprecia que ciertas características de la invención, que se describen por claridad, en el contexto de realizaciones separadas, también se pueden proporcionar combinadas en una única realización. A la inversa, varias características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una única realización, también se pueden proporcionar por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como sea adecuado en cualquier otra realización descrita de la invención. Ciertas características descritas en el contexto de varias realizaciones no deben considerarse características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización sea inoperante sin esos elementos.

Varias realizaciones y aspectos de la presente invención, Como se ha descrito anteriormente en la presente memoria y como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación, encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

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

En general, la nomenclatura utilizada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas de ADN molecular, bioquímico, microbiológico y recombinante. Tales técnicas se explican a fondo en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vol. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); las metodologías mostradas en las Patentes de Estados Unidos Núm. 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (ed), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (ed), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen exhaustivamente en las bibliografía relacionada con patentes y científica, véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Núm. 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., Eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todas las cuales se incorporan como referencia como si se expusieran en su totalidad en la presente memoria. Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de la presente memoria. Se cree que sus procedimientos son bien conocidos en la técnica y se proporcionan para la comodidad del lector. Toda la información contenida en las mismas se incorpora en la presente memoria como referencia.

Ejemplo 1

Expresión diferencial de los miR en neuronas serotoninérgicas.

Materiales y procedimientos experimentales

Micromatriz de MicroARN de neuronas 5HT

Las células del rombencéfalo del día 12 embrionario de los ratones YFP ePET se cultivaron y clasificaron para distinguir las neuronas 5HT de las neuronas circundantes que no son 5HT. El ARN total, incluida la población de miARN, se purificó, marcó e hibridó en el número de diseño 021828 de Agilent Mouse miARN Microarray (Agilent Tech, Mississauga, ON, Canadá) basado en la versión 12.0 de Sanger miRBase de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las micromatrices se exploraron y los datos se extrajeron y procesaron utilizando el soporte lógico Feature Extraction (Agilent Technologies). Después de la exploración, se analizaron los datos de intensidad de salida de los archivos GeneView.txt para cuantificar la expresión relativa diferencial de los micro-ARN utilizando el Paquete Partek® Genomics (Partek Inc., St. Louis, MO). Los datos se transformaron en log2, el cuantil se normalizó y se filtró de acuerdo con el indicador "glsGeneDetected" en el archivo GeneView. De 666 miR murinos, quedaron 198 para un análisis adicional en esta etapa de filtrado. Los miR expresados diferencialmente se identificaron mediante el uso de un umbral de un cambio de 1,5 veces con significación de acuerdo con ANOVA. Los contrastes se calcularon dentro de la prueba ANOVA. La corrección de Benjamini y Hochberg se utilizó para la reducción de falsos positivos (corrección de prueba múltiple).

Clonación de 3' UTR en plásmido de expresión de luciferasa Psicheck2

Las secuencias 3'UTR de Slc6a4, Htr1a, MaoA y Tph2 se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico de ratón o ADNc total de cerebro. Los fragmentos de PCR 3'UTR se ligaron en un vector pGEM-T Easy (Promega) de acuerdo con las indicaciones del fabricante, y se subclonaron adicionalmente en una solo sitio *NotI* en el extremo 3' de la luciferasa en el plásmido informador Psicheck2 (Promega). Las secuencias 3' UTR mutadas, que carecen de secuencias semilla de miR-135, se sintetizaron con cebadores que sobresalen a través de la secuencia de emparejamiento de semilla. La orientación de la clonación se verificó mediante cortes de diagnóstico y secuenciación.

Transfecciones y ensayo de luciferasa

Se cultivaron células HEK293T en poli-L-lisina en formato de 48 pocillos hasta una confluencia de 70-85% y se transfectaron empleando polietilenimina con los siguientes plásmidos: 5 ng de plásmido Psicheck2-3'UTR y 215 ng de vector que se expresa de manera anormalmente alta para un miARN específico, o plásmidos vacío-miR-vec que se expresan de manera anormalmente alta. Veinticuatro horas después de la transfección, se lisaron las células y se sometió a ensayo la actividad de los informadores de luciferasa como se ha descrito anteriormente [Chen A. et al. Mol Endocrinol (2005) 19: 441-58]. Los valores de luciferasa de Renilla se normalizaron para controlar los niveles de luciferasa de luciérnaga (transcritos a partir del mismo vector pero no afectados por las 3'UTR analizadas) y se promediaron en seis repeticiones de pocillos por condición.

Animales y alojamiento

Ratones machos adultos C57BL/6J, de 10 semanas de edad (Harlan, Jerusalén, Israel) se alojaron en una sala con temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) en un ciclo inverso de luz/oscuridad de 12 horas. La comida y el agua estaban disponibles *ad libitum*. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Instituto de Ciencia Weizmann.

Paradigmas del estrés por inmovilización aguda

Los ratones adultos se introdujeron en un tubo ventilado de 50 ml durante 30 minutos durante su ciclo de oscuridad.

Crónica derrota social

Los ratones fueron sometidos a un protocolo de derrota social como se ha descrito anteriormente [Krishnan V. et al. Cell (2007) 131: 391-404]. Brevemente, los ratones se colocaron en una jaula de alojamiento de un ratón ICR agresivo e interactuaron físicamente durante cinco minutos. Durante este tiempo, el ratón ICR atacó al ratón intruso y el intruso mostró una postura subordinada. Después se colocaron unos divisores de plexiglás transparentes perforados entre los animales y los ratones permanecieron en la misma jaula durante 24 horas para permitir el contacto sensorial. Después se repitió el procedimiento con un ratón ICR desconocido durante cada uno de los siguientes 10 días.

Tratamiento antidepressivo

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

Microdisección del núcleo de rafe y recolecciones de plasma

Las muestras de cerebro se tomaron de ratones en el núcleo de rafe (NR) después de extraer el cerebro y colocarlo en una matriz acrílica para cerebro (Stoelting). Las secciones se tomaron utilizando cuchillas de afeitar normalizadas (GEM) basándose en marcadores anatómicos designados. Se utilizaron jeringas 14G romas para extraer la región NR de cortes de 3 mm extraídos de la matriz. Además, la sangre del tronco se recogió en tubos que contenían EDTA para evitar la coagulación. Después de la centrifugación a 3.500 g durante 30 minutos a 4°C, el plasma se separó y se mantuvo a -70°C hasta la purificación del ARN.

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

Los ARNm, incluidos los microARN, se aislaron a partir de neuronas clasificadas, perforaciones cerebrales congeladas y plasma empleando miRNeasy mini kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se trataron con miARN de kit de transcripción miScript Reverse para generar ADNc. Las muestras de ADNc se analizaron después utilizando el kit de PCR SYBR®Green (Qiagen) de acuerdo con las indicaciones del fabricante en el termociclador AB 7500 (Applied Biosystems). Se utilizaron cebadores específicos para cada miR junto con el cebador universal comercial, mientras que se utilizó ARNip U6 como control interno.

Tabla 1B: secuencias de cebadores utilizadas para PCR en tiempo real

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

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

Secuencia del cebador	Orientación	Tamaño del producto	Gen	
AGTTCTGCCGCTGATGATG (SEQ ID NO: 6)	efectora	2600 ^{con 2}	3' UTR de Htr1a	1
GCACAAATGGAGAGTCTGATT AAA (SEQ ID NO: 7)	antisentido		3' UTR de Htr1a	2
TGCCTTTAATGCAAAACAGC (SEQ ID NO: 8)	efectora	2000 ^{con 4}	3' UTR de MaoA	3
CCAAGTTTACAACCATCAAGC A (SEQ ID NO: 9)	antisentido		3' UTR de MaoA	4
ATCCGCATGAATGCTGTGTA (SEQ ID NO: 10)	efectora	760 ^{con 6}	3' UTR de Slc6a4	5
GTGGGTGGTGAAGAGACAC (SEQ ID NO: 11)	antisentido		3' UTR de Slc6a4	6
CCTACACGCAGAGCATTGAA (SEQ ID NO: 12)	efectora	870 ^{con 8}	3' UTR de Tph2	7
ACATCCCTGTGGGATTTGAG (SEQ ID NO: 13)	antisentido		3' UTR de Tph2	8
TGTCTTGCTTATATTTTCTCAGT AG (SEQ ID NO: 14)	efectora	320 ^{con 6}	3' UTR de Slc6a4 mutada	9
GAAAATATAAGCAAGACATCC CTGTT (SEQ ID NO: 15)	antisentido	440 ^{con 5}	3' UTR de Slc6a4 mutada	10

Secuencia del cebador	Orientación	Tamaño del producto	Gen	
AAAGATCCCTTTCCCAATG (SEQ ID NO: 16)	efectora	1400 ^{con 12}	3' UTR de Htr1a corta	11
CAGTGCGTCTTCTCCACAGA (SEQ ID NO: 17)	antisentido		3' UTR de Htr1a corta	12
ATAAGCAAGGGCCCAAAAGGA AGA (SEQ ID NO: 18)	efectora	1300 ^{con 12}	semilla 1 de 3' UTR de Htr1a mutada	13
TTTTGGGCCCTTGCTTATAAGT CC (SEQ ID NO: 19)	antisentido	120 ^{con 11}	semilla 1 de 3' UTR de Htr1a mutada 1	14
CTGCCCTGCCACATGTGTTTT AT (SEQ ID NO: 20)	efectora	170 ^{con 12}	semilla 2 de 3' UTR de Htr1a mutada	15
TAACAAATAAAAAACACATGTG GCA (SEQ ID NO: 21)	antisentido	1260 ^{con 11}	semilla 2 de 3' UTR de Htr1a 3 mutada	16
ACCGGTCATATGATTCCCCAGT TTCCTGCTTT (SEQ ID NO: 22)	efectora	199 ^{con 18}	Pre-mmu-miR135b	17
ACCGGTCCTCTGTGGCTGGTCC TTAG (SEQ ID NO: 23)	antisentido		Pre-mmu-miR135b	18

Clonación de miR135b sobre el vector viral de expresión

- 5 Se amplificó mediante PCR pre-miR-135b a partir de ADN genómico de ratón con cebadores que añadieron sitios de enzimas de restricción Agel y después se introdujo Slc6a4 en el vector pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI). Después de la secuenciación mediante pGEM-T Easy y la digestión de pGEM-T Easy y del vector pEGFP (Clontech laboratories Inc., Mountain View, CA) con Agel, la secuencia de miR-135b prematura se ligó al vector pEGFP para construir el plásmido de expresión pEGFP-miR-135b. Después de eso, pamFP-miR-135b se cortó con BamHI y BsrGI en paralelo para cortar el plásmido pCSC-E/Syn-eGFP con las mismas enzimas, y la secuencia de miR-135b-eGFP se ligó a pCSC-E/Syn para construir el plásmido pCSC-eSNY-pre-miR-135b-eGFP que se confirmó mediante análisis de endonucleasa de restricción y secuenciación de ADN.

Producción de vectores lentivirales.

- 15 Los lentivirus recombinantes se produjeron por transfección transitoria en células HEK293T, como se ha descrito anteriormente [Naldini L et al., Proc Natl Acad Sci U S A (1996) 93:11382-8]. Brevemente, los lentivirus infecciosos se recogieron a las 48 y 72 horas después de la transfección, se filtraron a través de filtros de acetato de celulosa de poros de 0,45 µm y se concentraron mediante ultracentrifugación.

Inyecciones intracerebrales de lentivirus.

- 25 Para proporcionar un control de precisión sobre la cirugía estereotáxica y el lugar de administración lentiviral, los autores de la presente invención inventores utilizaron un aparato estereotáxico guiado por ordenador y un nanoinyector motorizado (Angle Two™ Stereotaxic Instrument, myNeurolab). Como se describió previamente [Singer O. et al. Nat Neurosci (2005).8, 1343-9] los ratones se colocaron en un aparato estereotáxico bajo anestesia general, y las coordenadas se determinaron de acuerdo con lo definido por el atlas de Franklin y Paxinos. La preparación

lentiviral se administró utilizando una jeringa Hamilton conectada al sistema nanoinyector motorizado y la solución se inyectó a una velocidad de 0,2 µl cada minuto. Después de un período de recuperación de dos semanas, los ratones se sometieron a estudios fisiológicos y de comportamiento, y a continuación fueron anestesiados y perfundidos con paraformaldehído tamponado con fosfato al 4%. Los cerebros fijados se seccionaron en serie en láminas de 30 µ para confirmar la precisión del lugar de la inyección, utilizando inmunohistoquímica.

Inmunohistoquímica

El procedimiento utilizado para la inmunohistoquímica se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente [Chen A et al. J Neurosci (2006) 26: 5500-10]. Para la inmunotinción con GFP, los autores de la presente invención utilizaron anticuerpos anti GFP biotinilados producidos en conejo como anticuerpo primario (Abcam, Cambridge, Reino Unido), y Cy2 conjugado con estreptavidina como anticuerpo secundario (Jackson Immunoresearch Laboratories Inc, West Grove, PA, EE. UU.).

Evaluaciones de comportamiento

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

Prueba de suspensión de cola

La prueba de suspensión de cola se realizó en el TSE Tail Suspension Monitor (TSE Systems, Bad Homburg, Alemania). Cada ratón fue encintado por la punta de su cola y suspendido del sensor de fuerza durante 10 minutos. El tiempo consumido durante la inmovilidad y el tiempo consumido durante la lucha se calcularon y registraron mediante el soporte lógico basándose en umbrales preestablecidos.

Prueba de natación forzada modificada

La prueba de suspensión de la cola se realizó como se ha descrito anteriormente [Krishnan V y Nestler EJ, Nature (2008) 455: 894-902]. En resumen, el aparato utilizado fue un cubo de plástico, de 18 cm de diámetro, lleno de agua a 25°C hasta una profundidad de 15 cm. Cada ratón se colocó en el centro del cubo para iniciar una sesión de prueba grabada en video de 6 minutos. La duración del tiempo que permaneció inmóvil durante los 2 a 6 minutos de prueba se anotó automáticamente empleando EtoVision XT (Noldus, Wageningen, Países Bajos).

Actividad locomotora

Para controlar la posibilidad de efectos de comportamiento originados por las diferencias en el movimiento ambulatorio, se examinó la actividad locomotora de los ratones durante un período de 48 horas, que estuvo precedido de unos pocos días de habituación. Los ratones se alojaron solos en jaulas domésticas especializadas y la locomoción se midió utilizando el sistema InfraMot (TSE Systems, Bad Hamburg, Alemania).

Análisis estadístico

Los datos se expresaron como medias $\pm$ ETM. Para probar la significación estadística, se utilizó la *prueba t* de Student en los casos en que solo se compararon dos grupos, tal como por ejemplo entre la qPCR de validación de micromatrices. Se utilizó ANOVA de una vía para comparar entre múltiples grupos, tal como entre los diferentes tratamientos en el ensayo con luciferasa. Se utilizaron ANOVA de dos vías en los casos de 2 variables independientes, tales como la inyección NRI de SSRI, tanto en duración aguda como crónica. Se utilizaron *pruebas t* post hoc cuando fue necesario para revelar significación estadística. Las diferencias entre los grupos se consideraron significativas cuando $P < 0,05$.

Resultados

Las neuronas 5HT se aislaron del NR de los embriones YFP ePET, y su perfil de expresión de miR se comparó con las neuronas que no eran 5HT, obtenidas a partir del mismo núcleo, utilizando la micromatriz miR (Figura 1A). Se encontró que catorce miR estaban regulados por incremento y veintisiete regulados por disminución más de 2 veces en las neuronas 5HT en comparación con las neuronas que no eran 5HT (véanse las Tablas 2A-B, a continuación). La validación representativa de los resultados de la matriz se realizó mediante PCR en tiempo real para los miR regulados por incremento en las neuronas 5HT tales como miR-375 ($P = 0,0071$; Figura 1B) y regulados por disminución, tales como miR-135a ($P = 0,0075$; Figura 1C). Con el fin de estudiar más a fondo el papel de los miR como moduladores de las neuronas 5HT, se realizó un extenso análisis bioinformático de manera hipotética. La predicción de la elección como diana de los genes conocidos relacionados con la serotonina que se ha demostrado previamente que están asociados con psicopatologías se cruzó con los resultados de la micromatriz. Los siguientes cuatro genes codificantes de proteínas expresados en neuronas 5HT en el NR se seleccionaron para la prueba: transportador de serotonina, responsable de la recaptación de 5HT (también conocido como SERT o Slc6a4);

receptor 1a inhibidor de serotonina (también conocido como Htr1a); triptófano hidroxilasa 2 (Tph2), la enzima limitante de la velocidad de la síntesis de 5HT en el cerebro; y monoaminohidroxilasa (MaoA), que desactiva 5HT. Las predicciones de la elección como diana por el microARN de estos genes se realizaron utilizando dos algoritmos diferentes basados en la web: Target Scan [www(dot)targetscan(dot)org] y Miranda [www(dot)microrna(dot)org] y se cruzaron con la lista de los 91 miR alterados en al menos $\pm 1,5$ en la matriz de miR de las neuronas 5HT, en comparación con las células que no son 5RH. Sobre la base de los datos de la matriz de miR y el análisis bioinformático, se seleccionaron ocho miR para más estudios *in vitro* (Figura 1D-G).

Tabla 2A: Lista de los miR regulados por incremento en las neuronas 5HT en comparación con las no serotoninérgicas (más de 2 veces).

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

Tabla 2B: Lista de los miR regulados por disminución en las neuronas 5HT en comparación con las no serotoninérgicas (más de 2 veces).

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

Multiplicidad de cambio	Nombre del micro-ARN
-2,19	mmu-miR-300
-2,17	mmu-miR-376a
-2,13	mmu-miR-127
-2,12	mmu-miR-15b
-2,07	mmu-miR-101a
-2,06	mmu-miR-16
-2,05	mmu-miR-324-5p
-2,05	mmu-miR-434-5p
-2,03	mmu-miR-92a
-2,00	mmu-miR-669i

Se realizaron ensayos de luciferasa *in vitro* para probar las interacciones miR-diana entre la 3'UTR del gen relacionado con 5HT analizado y los miR que se pronosticó que se dirigirían supuestamente al mismo. Los autores de la presente invención encontraron que la 3'UTR de Tph2 era reprimido levemente (en aproximadamente 20%) por miR-27b (P = 0,0051) y miR-181C (P = 0,0305, Figura 1H) y la 3'UTR de MaoA también fue reprimida por miR-27b (P = 0,0008, Figura 1I). La elección como diana de la 3'UTR de Slc6a4 por miR-135 (Figura 2A y 2C) y la 3'UTR de Htr1a (Figura 2B y 2D) dio como resultado una fuerte represión de la traducción de estos transcritos. Mientras que miR-135a condujo a aproximadamente 30% de represión de Slc6a4 (P = 0,014) y Htr1a (P <0,0001), miR-135b causó aproximadamente 50% de represión de Slc6a4 (P = 0,0002) y Htr1a (P <0,0001). Además, se generó una represión significativa de 3'UTR de Htr1a por miR-335 (P <0,0001), miR-181c (P = 0,0029) y miR-26a (P <0,0001, Figura 2D). El análisis bioinformático del enfoque genómico adicional reveló una fuerte conservación de los emparejamientos de semillas de miR-135 en la 3'UTR de slc6a4 (Figura 2E) y en una de los dos emparejamientos de semillas identificados en la 3'UTR de Htr1a (Figura 2F). Los estudios de mutación en la 3'UTR del transcrito de Slc6a4, que eliminó el emparejamiento de semilla de miR de miR-135, revelaron que la elección como diana de Slc6a4 por miR-135a y miR-135b estaba mediada a través de su secuencia de emparejamiento de semilla. La represión inducida por el miR-135 fue completamente bloqueada por la mutación en 3'UTR de Slc6a4 (Figura 2G). La mutación de los emparejamientos de semilla de miR-135 de Htr1a individualmente o a la vez reveló que miR-135a estaba reprimiendo la 3'UTR de Htr1a a través del emparejamiento de semilla distal y no proximal, mientras que miR-135b actúa a través de ambos sitios pronosticados (Figura 2H).

Los autores de la presente invención evaluaron además la regulación de la expresión de RN-miR-135 *in vivo* siguiendo diferentes retos ambientales o tratamientos farmacológicos. Después de la manipulación de los ratones (es decir, estrés de inmovilización agudo), se eliminó el NR, se extrajo el ARN y se analizaron los niveles de miR-135 utilizando PCR en tiempo real. Dado que se sabe que los niveles de 5HT son alterados por el estrés agudo, los autores de la presente invención evaluaron los niveles de miR-135 en diferentes puntos de tiempo después del estrés de restricción agudo, y encontraron que tanto miR-135a como miR-135b estaban regulados por disminución 90 minutos después del estrés agudo (P <0,0001). Los niveles reducidos de estos miR aún permanecieron 24 horas después del estrés, en comparación con los ratones de control (P = 0,0357 para miR-135a, Figura 3A; P = 0,0055 para miR-135b, Figura 3B). Además, dado que se sabe que las funciones neuronales 5HT y los niveles de expresión de Slc6a4 y Htr1a se ven fuertemente afectados en pacientes deprimidos y después de tomar medicamentos antidepresivos, los autores de la presente invención evaluaron los niveles de las dos variantes de miR en ratones expuestos a un modelo ambiental para la inducción de comportamientos similares a la depresión (modelo de derrota social crónica) y al antidepresivo tricíclico, imipramina. Curiosamente, el estrés por derrota social crónica no alteró los niveles de miR-135 en el núcleo del rafe, sin embargo, la imipramina administrada de forma aguda o crónica, tanto en ratones estresados como no estresados, aumentó los niveles de expresión miR-135a (P = 0,003; Figura 3C) y miR-135b (P = 0,0093; Figura 3D) en el RN. Dado que la imipramina no es un inhibidor específico de la recaptación de 5HT, los autores de la presente invención evaluaron adicionalmente el efecto de los inhibidores selectivos agudos y crónicos de la recaptación de serotonina (SSRI), Fluoxetina y los inhibidores de la recaptación de noradrenalina (NRI), Reboxetina y encontraron un aumento robusto en los niveles de miR-135a después del tratamiento con SSRI tanto agudo como crónico (P <0,0001, Figura 3E), y no en los niveles de miR-135b en el NR (Figura 3F). Intrigados por el cambio en los niveles de miR-135 en el NR después del tratamiento con SSRI, los autores de la presente invención evaluaron los niveles de miR-135 circulante en el plasma de ratones y encontraron una disminución robusta en los niveles de miR-135a después de la administración de SSRI aguda y crónica (efecto principal para medicamento P <0,0001, Figura 3G) y ningún efecto en los niveles circulantes de miR-135b (Figura 3H), lo que sugiere una fuerte correlación inversa entre los niveles de miR-135a en el NR y el plasma después de la administración de SSRI (Figura 3I y 3J).

Para explorar adicionalmente la importancia de los niveles de miR-135 en todo el contexto animal, los autores de la presente invención manipularon los niveles de miR-135 *in vivo* específicamente en el NR de ratones adultos y probó sus efectos en los comportamientos parecidos a la depresión de los ratones. Con este fin, los autores de la presente invención construyeron lentivirus recombinantes que expresan de manera anormalmente alta miR-135b específicamente en neuronas utilizando el promotor de sinapsina mejorado, que también co-expresó el informador de GFP (véase la sección de materiales y procedimientos experimentales más arriba y la Figura 4A). Los autores de la presente invención evaluaron los lentivirus *in vivo* inyectándolos en el NR de ratones adultos y comparando los niveles de miR-135b en el NR para controlar los ratones a los que se habían inyectado los lentivirus. El análisis de PCR en tiempo real de los niveles de miR-135b reveló una inducción de 10 veces en comparación con los ratones a los que se había inyectado el lentivirus control ($P = 0,0032$, Figura 4B). Los ratones adultos inyectados que tenían una expresión anormalmente alta de miR-135b se expusieron a derrota social crónica, para iniciar comportamientos similares a la depresión, y posteriormente se evaluaron conductualmente. Después de las pruebas de comportamiento, los ratones se perfundieron y los cerebros se analizaron para determinar la ubicación del sitio de inyección (Figuras 4C-D). Los ratones con expresión anormalmente alta de miR-135 en NR demostraron un tiempo de inmovilidad reducido en la natación forzada ($P = 0,0088$ en el minuto 3 y $P = 0,00330$ en el minuto 4; Figura 4E) y en las pruebas de suspensión de la cola ($P = 0,07356$ en los últimos 5 minutos de la prueba, Figura 4F) sin ningún cambio observado de locomoción en su jaula (Figuras 4G-H), lo que sugiere un efecto antidepresivo para la expresión anormalmente alta de miR-135.

Tomados en conjunto, los autores de la presente invención determinaron la huella dactilar de expresión específica de miR de las neuronas serotoninérgicas y no serotoninérgicas del RN. Los autores de la presente invención cruzaron este conjunto de datos único con la predicción bioinformática para los miR dirigidos a los genes relacionados con 5HT. Los autores de la presente invención evaluaron la predicción de la elección como diana *in vitro* para Tph2, MaoA, Slc6a4 y Htr1a utilizando los ensayos de luciferasa de 3'UTR y en estudios de mutación y revelaron, entre otras interacciones miR-diana, un fuerte efecto inhibidor para miR-135, en la 3'UTR tanto de S16a4 como de Htr1a. Además, los autores de la presente invención demostraron que miR-135 en el NR está regulado por el estrés agudo y por la administración de antidepresivos, específicamente por los fármacos SSRI. Además, los autores de la presente invención identificaron una correlación inversa entre los niveles de miR-135a en el NR y sus niveles en plasma después de la administración de SSRI. Finalmente, los autores de la presente invención demostraron que la expresión anormalmente alta específica de sitio de miR-135 en el NR de ratones adultos conduce a una disminución de las comportamientos similares a la depresión después de la derrota social.

Ejemplo 2

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

Materiales y procedimientos experimentales

Clonación de 3'UTRs en plásmido de expresión de luciferasa Psicheck2

La secuencia 3'UTR de ADRb1 se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de ratón. Las secuencias 3'UTR mutadas, que carecen de los cuatro emparejamientos de semilla de miR-19, fueron sintetizadas por Epoch Biolabs, Inc. (TX, EE. UU.). Los fragmentos de PCR de las 3'UTR se ligaron en un vector pGEM-T Easy (Promega) de acuerdo con las indicaciones del fabricante, y se subclonaron adicionalmente en un solo sitio *NotI* en el extremo 3' de la luciferasa en el plásmido informador Psicheck2 (Promega). La orientación de la clonación se verificó mediante cortes de diagnóstico y secuenciación.

Transfecciones y ensayo de luciferasa.

Se cultivaron células HEK293T o células neuronales HT22 en poli-L-lisina en formato de 48 pocillos hasta una confluencia de 70-85% y se transfectaron empleando polietilenimina con los siguientes plásmidos: plásmido Psicheck2-3'UTR, expresión anormalmente alta de pre-mmu-miR-19b en plásmido pEGFP o plásmido pEGFP solo (clontech), plásmido modificado para reducir la expresión (KD) de miR-19b (Genecopoeia) o plásmido KD de control (Genecopoeia). Veinticuatro horas después de la transfección, se lisaron las células y se sometió ensayo la actividad de los informadores de luciferasa como se ha descrito anteriormente [Chen A. et al. Mol Endocrinol (2005) 19: 441-58]. Los valores de luciferasa de Renilla se normalizaron para controlar los niveles de luciferasa de luciérnaga (transcritos a partir del mismo vector pero no afectados por las 3'UTR evaluadas) y se promediaron en seis repeticiones de pocillos por condición.

Resultados

El análisis bioinformático para los genes relacionados con el estrés con secuencias diana distintas de miARN conservadas evolutivamente que contienen varias repeticiones en su 3'UTR reveló que miR-19 es un fuerte candidato para la selección del receptor adrenérgico beta tipo uno (Adrb1), con tres muy conservadas y un

emparejamiento de semilla de miR-19 menos conservado en Adb1 3'UTR. Adb1 es un receptor adrenérgico que se expresa en varias regiones del cerebro, incluyendo la amígdala, el hipocampo y el núcleo paraventricular (PVN). Se describió previamente que Adb1 de amígdala afectaba el comportamiento similar a la ansiedad [Fu A et al., Brain Res (2008) 1211: 85-92; Rudoy CA y Van Bockstaele EJ, Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry (2007) 31: 1119-29] y la memoria del miedo [Roozendaal B et al., J Neurosci (2004) 24: 8161-9; Roozendaal B et al., Neuroscience (2006) 138: 901-10]. Curiosamente, se encontró Adb1 en células positivas para CRF de la amígdala y es un receptor acoplado a proteína G (GPCR) que ejerce su efecto a través de G activando adicionalmente la adenilato ciclasa (AC). Existen 10 genes conocidos que codifican AC, a saber, ADCY1-10. Se pronosticó bioinformáticamente que tres de estos (ADCY1, ADCY7 y ADCY9) eran elegidos como diana para miR-19. ADCY1 tiene una expresión específica de cerebro y se demostró anteriormente que la expresión anormalmente alta del mismo en el prosencéfalo del mouse mejora la memoria de reconocimiento y la LTP [Wang H et al., Nat Neurosci (2004) 7:635-42].

Para investigar si miR-19 en realidad regula la expresión de Adb1 o ADCY1 a través de sus presuntas secuencias diana en la 3'UTR de Adb1 o la 3'UTR de ADCY1, se clonaron una forma intacta o mutada de la 3'UTR de Adb1 (Figura 5) o la 3'UTR de ADCY1 aguas abajo del gen de la luciferasa en el plásmido de expresión Pscheck2. En la forma mutada de la 3'UTR de ADRb1, los 4 emparejamientos de semilla para miR-19b estaban ausentes (Figura 5). En la forma mutada de la 3'UTR de ADCY1 parcial, solo estuvo ausente el emparejamiento de semilla conservado (de 3).

Se utilizó el ensayo de luciferasa para determinar la naturaleza de la interacción entre miR-19 y la 3'UTR de Adb1 y también entre miR-19 y la 3'UTR de ADCY1. En las células HT22, que expresan endógenamente niveles bajos de miR-19, no se encontraron diferencias entre los niveles de luciferasa controlados por la forma intacta o mutada de la 3'UTR de Adb1 (Figura 6A). Sin embargo, cuando miR-19b se expresó de manera anormalmente alta en células HT22, los niveles de luciferasa fueron significativamente más bajos (aproximadamente 2 veces) cuando fueron impulsados por la forma intacta en relación con la forma mutada de la 3'UTR de Adb1 (además de una reducción general, aparentemente no específica de la expresión de luciferasa normalizada (Figura 6B). En las células HEK293T que expresan de manera endógena altos niveles de miR-19b, los niveles de expresión de luciferasa regulados por la 3'UTR de Adb1 fueron 2-4 veces más bajos que los expresados cuando se regulan por la forma mutada de la 3'UTR de Adb1 (Figuras 6C).

Se utilizó el sistema de reducción de la expresión (KD) de MiR para manipular los niveles de miR-19 en las células HEK293T. A saber, (1) sondas miRCURY LNA KD (Exiqon, MA, EE. UU. Figura 6D) y (2) secuencia de reducción de la expresión basada en plásmidos miArrest (Genecopoeia, Rockville, MD, EE. UU., Figura 6E). LNA-Anti-miR-19 potenció los niveles de luciferasa expresados cuando se regulaba bajo la 3'UTR de Adb1 en aproximadamente 20% con respecto a la sonda KD con nucleótidos desorganizados de control y no tuvo efecto en la forma mutada de la 3'UTR de Adb1 (Figura 6D). Mientras, miR-19b KD basado en plásmido, causó un aumento de hasta 2 veces en la expresión de luciferasa regulada por la forma intacta de la 3'UTR de Adb1 con respecto a la secuencia KD de Control (Figura 6E). No se logró un rescate completo de los niveles de luciferasa con respecto a los impulsados por la forma mutante de la 3'UTR de Adb1. Esto se puede explicar ya sea por la especificidad de miR-19b de la sonda/secuencia genómica (regulación de miR-19a), los altos niveles de miR-19 en las células HEK293T que pueden ser difíciles de regular por disminución, o el efecto de otros posibles miARN expresados en células HEK293T que pueden unirse a las mismas secuencias de emparejamiento de semilla en la 3'UTR de Adb1.

Ejemplo 3A

MiR-19a y MiR-19b están regulados por incremento en PFC y la amígdala después de estrés crónico

Materiales y procedimientos experimentales

Animales y alojamiento

Se cruzan ratones miR 17-92 *flx/flx* [Ventura A et al., Cell (2008) 875-86;(5)132;7], con ratones CamKIIa-Cre [Dragatsis I et al Genesis. (2000) 26(2):133-5]. Los ratones transgénicos o ratones machos adultos C57BL/6J se alojan en una sala con temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) en un ciclo inverso de luz/oscuridad de 12 horas. El alimento y el agua estaban disponibles *ad libitum*. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales del Instituto de Ciencia Weizmann.

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

La secuencia KD de MiR-19b se clonó en un plásmido lentiviral después del promotor de la ARN polimerasa III-HI. Además, la secuencia de Pre-miR-19b se clonó después de un promotor específico neuronal (Sinapsina potenciada, ESyn) en un plásmido lentiviral. Los lentivirus se generan para ambos experimentos de expresión anormalmente alta (OE) de miR-19b-KD y Pre-miR-19b *in vivo*. Estos lentivirus se utilizan para manipular los niveles de miR-19b en las

regiones diana donde se encuentran alterados los niveles de miR-19 después de un reto conductual/farmacológico.

Ratones generadores que carecen de miR-19 en el prosencéfalo.

Para generar ratones que carecen de miR-19 en el prosencéfalo, los autores de la presente invención cruzan ratones que portan el gen que codifica la recombinasa Cre bajo el promotor CamKIIa, con ratones que portan una forma condicional del grupo miR miR17-92. La familia MiR-19 incluye miR-19a y miR-19b. En el genoma del ratón, miR-19b tiene dos copias idénticas, miR-19b-1 y miR-19b-2. MiR19a y miR-19b-1 están ubicados en el mismo grupo de miARN, es decir, miR17-92, mientras que miR-19b-2 está ubicado en un locus genómico diferente, miR106a-363. Este último parece tener poca o ninguna expresión en tejidos del ratón y, por lo tanto, se espera que la eliminación del cúmulo miR17-92 sea suficiente para permitir un efecto profundo en los niveles de expresión de miR-19a y miR-19b en el prosencéfalo.

Retos conductuales/farmacológicos

Los ratones que carecen del cúmulo miR-17-92 en el prosencéfalo, o los ratones en los que miR-19 fue manipulado específicamente (expresado de manera anormalmente alta o regulado por disminución (KD) en regiones específicas del cerebro) se examinarán para determinar los niveles de expresión de ADRb1, ADCY1 y otros transcritos y productos génicos. Estos animales también serán evaluados para detectar el comportamiento similar a la ansiedad, actividad locomotora y rendimiento de la memoria. Además, los niveles de expresión de miR-19a y miR-19b se examinan en diferentes regiones de interés (p. ej., el hipocampo, la amígdala y el prosencéfalo) después de un tratamiento sistémico agudo y crónico con el inhibidor de la recaptación de noradrenalina Reboxetina en ratones WT.

Resultados

El vínculo fisiológico entre miARN-19 y ADRb1 se estudió mediante la evaluación del nivel de miR-19a/b en la corteza prefrontal (PFC) de ratones a los que se inyectó Reboxetina, un inhibidor de la recaptación de noradrenalina (NRI), ya sea aguda o crónicamente (Figuras 12A-D). Como se muestra en las Figuras 12A-D, los niveles de miR-19 a/b se regularon por disminución después de la administración aguda de Reboxetina (Figura 12A, B) y se regularon por incremento después de la administración crónica de Reboxetina (Figura 12C, D).

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

Ejemplo 3B

MiRNA-19 y receptor cannabinoide 1 (CB1)

Materiales y procedimientos experimentales

Animales y alojamiento

Como se ha descrito en el Ejemplo 3A, anterior.

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

Como se ha descrito en el Ejemplo 3A, anterior.

Resultados

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

Se utilizó un ensayo de luciferasa para determinar la naturaleza de la interacción entre miARN-19 y la 3'UTR de CB1. Cuando miARN-19b se expresó de manera anormalmente alta en células HT22 junto con la 3'UTR de CB1, los niveles de luciferasa fueron significativamente (50%) más bajos en comparación con GFP expresada de manera

anormalmente alta con la misma 3'UTR (Figura 14), lo que respalda un posible papel para miR-19 en la regulación de los niveles de CB1. Se llevan a cabo experimentos de mutación adicionales para verificar el papel de la secuencia semilla de miR-19 pronosticada para la regulación observada (como se ha descrito para Adbl anteriormente).

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

Como se muestra en los presentes resultados, el MiRNA-19 parece regular tanto Adbl como CB1 *in vitro*. Se llevan a cabo la expresión anormalmente alta y regulación para reducir la expresión de miR-19 empleando, por ejemplo, los lentivirus suministrados específicamente al BLA, donde pueden alterar los niveles de Adbl y CB1, así como pruebas que examinan el desempeño de los ratones en paradigmas de aprendizaje y memoria como el condicionamiento del miedo con y sin exposición a desafíos estresantes.

Ejemplo 3C

Identificación de miARN expresados diferencialmente en ratones sometidos a estrés crónico

Materiales y procedimientos experimentales

Inmunoprecipitación de la proteína Ago2.

Se homogeneizaron conjuntos de 3 amígdala de 3 animales que forman parte del mismo grupo ("Susceptible", "Resiliente" o de Control) en un tampón NP40 que se complementó con un inhibidor de ARNasa, un inhibidor de proteasa y un inhibidor de fosfatos. Las muestras se mantuvieron en agitación constante durante 2 horas a 4°C. Las muestras se centrifugaron a continuación durante 20 minutos a 12.000 rpm a 4°C en una microcentrífuga, el sobrenadante se colocó en un tubo de nueva aportación mantenido en hielo y se descartó el sedimento. Las esferas magnéticas de proteína G (Dynabeads, Invitrogen) se incubaron con el anticuerpo monoclonal Ago2 (WAKO) con rotación a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de varios lavados, las muestras se añadieron a las esferas de proteína G recubiertas con Ago2 y se incubaron durante la noche a 4°C bajo agitación. Al día siguiente, las esferas se lavaron 3 veces con PBS. Para la purificación de ARN, las esferas se homogeneizaron en tampón RLT (kit RNeasy, protocolo complementario de miARN). Para el análisis de transferencia Western, las esferas se hirvieron en tampón de muestra para liberar la proteína de las esferas.

Purificación de ARN y micromatriz

El ARN de las muestras de inmunoprecipitación de Ago2 se aisló utilizando el kit RNeasy plus (Qiagen) siguiendo el Protocolo 1 complementario de Qiagen: Purificación del ARN total que contiene miARN. El ARN para todos los demás propósitos se aisló de los troqueles cerebrales congelados utilizando miRNeasy Mini Kit (Qiagen) de acuerdo con la recomendación del fabricante, y la integridad del ARN se evaluó utilizando el bioanalizador Agilent 2100. El ARN derivado de tejidos de ratones estresados después de la inmunoprecipitación con Ago2 se analizó adicionalmente en las matrices Affymetrix miRNA 2.0 (protocolo de ARN enriquecido) y la matriz Affymetrix Mouse Gene 1.0 ST.

Resultados

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

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

Con el fin de verificar que el complejo Ago2 pueda precipitarse con su ARN unido, la IP se realizó en la amígdala de ratones atímicos. La IP se realizó utilizando esferas magnéticas de proteína G que reaccionaron con el anticuerpo monoclonal Ago2. Como se muestra en la Figura 17B, precipitó una banda específica de Ago2 de un extracto de células NIH 3T3 (Figura 17B, calle 1) o de un extracto de tejido de amígdala (Figura 17B, calle 2).

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

- 5 Por lo tanto, al reducir el complejo Ago2 y analizar el miARN así como las poblaciones de ARNm en el material precipitado, hubo una mayor posibilidad de descubrir una conexión correcta entre un miARN dado y su 3' UTR de ARNt elegida como diana en regiones específicas del cerebro.

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

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

- 15 Después de 10 días del paradigma de la derrota social, los ratones se clasificaron en 3 grupos: Control, "Susceptible" y "Resiliente". Un ratón se caracterizó como "Susceptible" cuando mostró evitación social cuando se encontró con un nuevo ratón de la misma cepa que lo atacó durante el paradigma de la derrota social. Un ratón se caracterizó como "Resiliente" si no evita el nuevo ratón agresivo e interactúa con él. La mayoría de los ratones sometidos a la derrota social suelen mostrar evitación social y, por lo tanto, se clasificarían como "Susceptibles".
20 Aproximadamente solo se espera que 10-20% de los ratones en un experimento sean "Resilientes". A continuación se muestra un ejemplo de la prueba de evitación social realizada.

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

- 30 Cuarenta ratones se sometieron al paradigma de la derrota social y cuarenta ratones sirvieron como control. Tras la prueba de evitación social, se seleccionaron 9 ratones "resilientes", 9 ratones "susceptibles" y 12 ratones de control para la microdissección cerebral. Las muestras de cerebro se tomaron 8 días después de la prueba de evitación social de la amígdala, BNST, PFC, rafe dorsal e hipocampo junto con la sangre del tronco.

- 35 Se combinaron grupos de 3 troqueles de amígdala obtenidos de 3 ratones diferentes y se realizó la inmunoprecipitación con anti-Ago2. Después de la IP, el ARN se extrajo del material precipitado. Después de extraer 3 amígdala de cada grupo, hubo 3 muestras de ARN de los ratones "Resilientes", 3 muestras de ARN de los ratones "Susceptibles" y 4 muestras de ARN de los ratones de control - un total de 10 muestras de ARN. Cada muestra se analizó en una micromatriz de ST de ratón, así como en una matriz de miARN (ambas Affymetrix). Se examinaron los genes y los miARN que estaban regulados por incremento o por disminución en cada uno de los 2
40 grupos: "Susceptible" o "Resiliente" con respecto al grupo de control. Si se produce una interacción entre un determinado miARN y un gen diana, los autores de la presente invención esperan que haya una correlación inversa en sus niveles totales. Sin embargo, se esperaba que el ARNm presente en el complejo RISC (precipitado con el anti-Ago2) estuviera a altos niveles debido a que aún no se había fragmentado, por lo tanto, al observar los datos de
45 la matriz, los autores de la presente invención examinaron los miARN y las posibles dianas de ARNm que estaban regulado por incremento o por disminución con respecto a la muestra de control debido a que esto era una indicación de que interactuaron en el complejo RISC.

Resultados de las micromatrices

- 50 La Tabla 3, a continuación, ilustra los resultados de la matriz preliminar analizados utilizando filtros convencionales.

Tablas 3A-B: Lista de los miARN de amígdala regulados por incremento (Tabla 3A) o regulados por disminución (Tabla 3B) después de IP con Ago2.

55

(Tabla 3A)

Regulado por incremento	Multiplicidad de cambio de Susceptible	Multiplicidad de cambio de Resiliente
mmu-miR-301a_st	1,96	2,11
mmu-miR-15a_st	1,66	1,87
mmu-miR-29a_st	1,42	1,82
mmu-miR-19b_st	1,97	2,34

Regulado por incremento	Multiplicidad de cambio de Susceptible	Multiplicidad de cambio de Resiliente
mmu-miR-146b_st	1,55	1,94
mmu-miR-181d_st	1,54	1,64
mmu-miR-146a_st	1,41	1,60
mmu-miR-27b_st	1,45	1,91
mmu-miR-20a_st	1,57	1,52
mmu-miR-30a_st	1,34	1,65
mmu-miR-100_st	1,41	1,55
mmu-miR-153_st	1,44	1,92
mmu-miR-194_st	1,57	1,78
mmu-miR-30c_st	1,40	1,66
mmu-miR-23a_st	1,51	1,70
mmu-miR-106a_st	1,62	1,61
mmu-miR-30b_st	1,43	1,70
mmu-miR-195_st	1,59	1,98
mmu-miR-30e_st	1,36	1,56
mmu-miR-126-3p_st	1,58	1,76
mmu-let-7i_st	1,49	1,57
mmu-miR-434-5p_st	1,30	1,55
mmu-miR-376b_st	1,64	1,99
mmu-miR-495_st	1,45	1,82
mmu-miR-369-5p_st	1,60	1,77
mmu-miR-421_st	1,71	1,53
mmu-miR-543_st	1,52	1,69
mmu-miR-410_st	1,44	1,76
mmu-miR-34b-5p_st	2,18	1,53

(Tabla 3B)

Regulado por disminución	Multiplicidad de cambio de Susceptible	Multiplicidad de cambio de Resiliente
mmu-miR-210_st	-1,59	-2,13
mmu-miR-298_st	-1,75	-2,08
mmu-miR-423-5p_st	-1,68	-1,94
mmu-miR-346_st	-1,74	-1,96
mmu-miR-139-3p_st	-1,71	-2,13
mmu-miR-320_st	-1,74	-2,03
mmu-miR-485_st	-1,53	-1,88
mmu-miR-491_st	-1,53	-2,01
mmu-miR-31_st	-1,30	-1,53
mmu-miR-92b_st	-1,20	-1,53
mmu-miR-93_st	-1,36	-1,50
mmu-miR-125a-3p_st	-1,32	-1,55

Regulado por disminución	Multiplicidad de cambio de Susceptible	Multiplicidad de cambio de Resiliente
mmu-miR-134_st	-1,47	-1,63
mmu-miR-323-5p_st	-1,43	-1,76
mmu-miR-345-5p_st	-1,30	-1,62
mmu-miR-341_st	-1,36	-1,89
mmu-miR-370_st	-1,33	-2,04
mmu-miR-433_st	-1,49	-1,75
mmu-miR-455_st	-1,40	-1,61

*Para ambas Tablas 3A-B, los datos se presentaron como multiplicidad de cambio para los ratones "Susceptibles" o "Resilientes" en comparación con el control. Los valores en negrita están significativamente alterados.

Varios miARN, que se han regulado por incremento significativamente en los grupos de ratones "Susceptible" y "Resiliente", se han seleccionado e ilustrado en un mapa de calor (véase las Figuras 19A-B).

5 Matriz de expresión génica (ARNm)

Tabla 4: Lista de los ARNm de amígdala regulados por incremento hasta después de IP con Ago2.

Regulado por incremento	Multiplicidad de cambio de Susceptible	Multiplicidad de cambio de Resiliente
Tnrc18	1,36	1,23
Ifi30	1,34	1,21
Adamts9	1,79	1,52
Fkbp5	1,35	1,26
Adh1	1,42	1,05
Pxdn	1,32	1,19
Impdh2	1,41	1,02
Pdzd2	1,31	1,31
Csmd3	1,33	1,44
Usf1	1,33	1,20
A2m	1,71	1,09
Ccnd3	1,34	1,10
Rrh	1,33	1,02
Wfikkn2	1,40	1,07
Fras1	1,48	1,34
Notch2	1,50	1,22
Fam38a	1,33	1,18
Histlh3f	1,31	1,19
Fam167a	1,31	1,05
Calm14	1,68	1,11
Tspan4	1,30	1,21
Dnahc6	1,38	1,07
Jag2	1,31	1,19
Shank2	1,60	1,42
Dock6	1,33	1,10

ES 2 732 427 T3

Regulado por incremento	Multiplicidad de cambio de Susceptible	Multiplicidad de cambio de Resiliente
Mamdc2	1,30	1,20
Sgms2	1,39	1,13
Iqub	1,51	1,11
Ubxn11	1,36	1,06
Wfdc2	1,53	1,11
Spef2	1,33	1,16
FGGY	1,31	1,14
Pcolce2	1,37	1,16
Thbs1	1,32	1,13
Dnahc7b	1,40	1,13
Nt5dc2	1,41	1,12
Slc4a2	1,34	1,07
Adamts 17	1,40	1,35
Plscr2	1,34	1,21
Clic6	1,43	1,13
St6galnac2	1,38	1,08
Amigo2	1,33	1,06
Trío	1,33	1,15
Lamb1-1	1,35	1,20
Sema3b	1,40	1,01
Fap	1,39	1,10
Frem1	1,51	1,20
Pon1	1,34	1,03
Plin4	1,43	1,24
Steap1	1,36	1,10
Rdh5	1,52	1,13
Cldn2	1,56	1,11
Frrs1	1,37	1,10
Spef2	1,36	1,07
Slco1a5	1,31	1,13
Ltc4s	1,35	1,17
Mfsd7c	1,37	1,14
Acss3	1,32	1,16
Hif3 a	1,36	1,17
Serpinb8	1,40	1,18
Pcolce	1,36	1,16
Dnmt3a	1,20	1,19
GILZ (Tsc22d3)	1,19	1,15
Sdk2	1,29	1,36

Regulado por incremento	Multiplicidad de cambio de Susceptible	Multiplicidad de cambio de Resiliente
Prg4	1,16	1,72
Fbn1	1,24	1,10
Slitrk6	1,11	1,28
Plxna1	1,30	1,16
Plxb2	1,25	1,10
Sema4b	1,29	1,14

* Los datos se presentan como multiplicidad de cambio para ratones "Susceptibles" o "Resilientes" en comparación con el control. Los valores en negrita están significativamente alterados.

Tabla 5: Lista de los ARNm de amígdala regulados por disminución después de IP con Ago2.

Regulado por disminución	Multiplicidad de cambio de Susceptible	Multiplicidad de cambio de Resiliente
Cyp2d10	-1,22	-1,34
Lonrf1	-1,32	-1,31
Btnl5	-1,64	-1,54
B2m	-1,33	-1,20
Tekt5	-1,36	-1,10
Prp2	-1,51	-1,02
Krtap5-1	-1,34	-1,10
Krtap5-4	-1,33	-1,10
Klhl3 8	-1,38	-1,07
Lo	-1,42	-1,03
Pcsk9	-1,33	-1,20
Dnahc3	-1,39	-1,22
Sgpp2	-1,37	-1,03
Opalina	-1,49	-1,28

Se analizan varios miARN potenciales y sus supuestas dianas en el cerebro.

5

Ejemplo 4a

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

10 Materiales y procedimientos experimentales

Extracción de ARN total

El tejido de la amígdala se diseccionó 90 minutos después de un procedimiento de estrés agudo. El ARN total se aisló utilizando el kit miRNeasy (Qiagen) para preservar los miARN. Los troqueles cerebrales congelados se transfirieron a un tampón de lisis y se homogeneizaron inmediatamente. Los cultivos primarios neuronales o cultivos de células N2a se lisaron en el pocillo, en hielo. El procesamiento adicional se realizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los extractos de ARN se almacenaron a -80°C hasta su uso.

20 Matriz de miARN

La expresión diferencial del miARN se analizó mediante micromatrices de miARN Agilent (Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.) o Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, CA, EE. UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para la evaluación de la expresión diferencial del miARN utilizando la matriz Agilent, se marcaron e hibridaron 100 ng de ARN total por muestra (3 muestras de control y dos muestras de estrés agudo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las matrices se escanearon utilizando un escáner de micromatrices de Agilent. Los datos se extrajeron

25

con el soporte lógico Agilent Feature Extraction v9 y se analizaron con Partek® Genomics Suite (Partek Inc., St. Louis, Missouri, EE. UU.). Los datos de los archivos GeneView.txt estaban sujetos a la transformación log y la normalización por cuantiles. Para la evaluación de la expresión diferencial del miARN utilizando la matriz Affymetrix, se marcó e hibridó 1 µg de ARN total por muestra (dos muestras de control y dos muestras de estrés agudo) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las matrices se escanearon utilizando un escáner de micromatrices Affymetrix. Los datos se extrajeron con el soporte lógico de escáner Affymetrix y se normalizaron con los parámetros predeterminados del soporte lógico Affymetrix miARNQCtool (ajuste de fondo, normalización por cuantiles, transformación log y determinación de umbrales). Los datos normalizados de los cuatro archivos se importaron al soporte lógico Partek Genomics. Los genes no presentados en ninguna de las micromatrices se filtraron. Debido a la diferencia en la distribución de miARN, se eligieron diferentes límites de la razón log (correspondientes a aproximadamente 1 error típico para cada matriz) para cada matriz: 0,2 para Agilent y 0,4 para Affymetrix. Los miARN con razones logarítmicas mayores que el límite se compararon entre las matrices y se informa sobre los miARN comunes.

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

La secuencia 3'UTR de CRFR1 se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de ratón. Los fragmentos de PCR de la 3'UTR se ligaron en un vector pGEM-T Easy (Promega) de acuerdo con las indicaciones del fabricante, y se subclonaron adicionalmente en un solo sitio *NotI* en el extremo 3' de la luciferasa en el plásmido informador Psicheck2 (Promega). La orientación de la clonación se verificó mediante cortes de diagnóstico y secuenciación.

Transfecciones y ensayo de luciferasa.

Las células HEK293T se cultivaron en poli-L-lisina en formato de 48 pocillos hasta una confluencia de 70-85% y se transfectaron utilizando polietilenimina con los siguientes plásmidos: plásmido Psicheck2-3'UTR, expresión anormalmente alta de pre-mmu-miR-15 en plásmido pEGFP o plásmido pEGFP solo (Clontech). Veinticuatro horas después de la transfección, las células se lisaron y la actividad de los informadores de luciferasa se sometió a ensayo como se ha descrito previamente [Chen A. et al. Mol Endocrinol (2005) 19: 441-58]. Los valores de luciferasa de renilla se normalizaron para controlar los niveles de luciferasa de luciérnaga (transcritos a partir del mismo vector pero no afectados por la 3'UTR evaluada) y se promediaron en seis repeticiones de pocillos por condición.

Resultados

miR-15a y miR-15b emergieron como regulados por incremento 90 minutos después del estrés agudo de restricción (Figura 7A-B). Se pronosticó bioinformáticamente que tanto miR-15a como miR-15b elegían como diana la 3'UTR de CRFR1 (Figura 7C). La expresión anormalmente alta in vitro de miR-15b en células HEK293T redujo significativamente los niveles de expresión de luciferasa controlados por la 3'UTR de CRFR1 (Figura 7D).

Ejemplo 4B

Efecto de miR15 en FKBP5

Materiales y procedimientos experimentales

Los ilustrados en el Ejemplo 4A, anteriormente en la presente memoria.

Resultados

De acuerdo con los resultados de la matriz, miR-15a y la proteína 5 de unión a FK506 (también conocida como FKBP5) se regularon por incremento en los ratones "susceptibles" y "resilientes" con respecto al grupo de control (Figuras 20A-B), lo que sugiere su regulación por incremento en el complejo RISC como resultado del estrés crónico.

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

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

Si efectivamente miR-15a regula el ARNm de FKBP5, se esperaba que si bien miR-15a y FKBP5 estarían regulados por incremento en el precipitado de Ago-2 (como lo muestran los resultados de la micromatriz, Fig. 20B), los niveles totales de cualquiera del ARNm o la proteína de FKBP5 en la muestra de amígdala disminuiría.

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

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

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

Ejemplo 4C

miR-181 regula los receptores de glutamato

Materiales y procedimientos experimentales

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

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

Derrota social crónica

Los ratones fueron sometidos a un protocolo de derrota social como se ha descrito anteriormente [Krishnan V. et al. Cell (2007) 131: 391-404]. Brevemente, los ratones se colocaron en una jaula de alojamiento de un ratón ICR agresivo donde interactuaron físicamente durante cinco minutos. Durante este tiempo, el ratón ICR atacó al ratón intruso y el intruso mostró una postura subordinada. Después se colocaron separadores de plexiglás transparentes perforados entre los animales y los ratones permanecieron en la misma jaula durante 24 horas para permitir el contacto sensorial. Después se repitió el procedimiento con un ratón ICR desconocido para cada uno de los siguientes 10 días.

Resultados

Los niveles de miR-181d aumentaron significativamente en ratones que sufrían estrés crónico (Figura 23). En un intento por encontrar interacciones entre miR-181 y las posibles diana de ARNm, los autores de la presente invención descubrieron que miR-181 puede regular potencialmente muchos tipos de receptores de glutamato. En general, los receptores de glutamato se pueden dividir en dos grupos, los receptores de glutamato ionotrópicos (iGluRs), que forman el poro del canal iónico que se activa cuando el glutamato se une al receptor, y los receptores de glutamato metabólicos (mGluRs), que activan indirectamente los canales de plasma en la membrana plasmática a través de una cascada de señalización que implica proteínas G.

De los muchos subtipos específicos de receptores de glutamato, es habitual referirse a los subtipos primarios por un producto químico que se une a él de manera más selectiva que el glutamato. Sin embargo, la investigación está en curso, a medida que se identifican los subtipos y se miden las afinidades químicas. Varios compuestos se utilizan habitualmente en la investigación de los receptores de glutamato y se asocian con los subtipos de receptores:

Tabla 6: Receptores de glutamato categorizados en subgrupos

Nombre	Tipo
Receptor NMDA	Ionotrópico
Receptor de kainato	
Receptor AMPA	

Nombre	Tipo
mGluR	Metabotrópico

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

- 5 Se ha demostrado anteriormente que miR-181a controla la expresión superficial de Gria2 en las neuronas del hipocampo [Saba R. et al., *Biología Molecular y Celular* (2012) 32(3):619-32]. Se están realizando ensayos de luciferasa para verificar la interacción miARN-mRNA. Además, una línea de ratones KO miR-181 condicional se cruza con una línea Cre específica obteniendo así una eliminación de miR-181 en núcleos cerebrales específicos.

10 Ejemplo 5a

MiR-182 un sintonizador fino de la actividad neuronal normal y del comportamiento psicopatológico

Materiales y procedimientos experimentales

15

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

La secuencia 3'UTR de Htr1a se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de ratón. Los fragmentos de PCR de la 3'UTR se ligaron en un vector pGEM-T Easy (Promega) de acuerdo con las indicaciones del fabricante, y se subclonaron adicionalmente en un solo sitio *NotI* en el extremo 3' de la luciferasa en el plásmido informador Psicheck2 (Promega). La orientación de la clonación se verificó mediante cortes de diagnóstico y secuenciación.

20

Transfecciones y ensayo de luciferasa.

25 Se cultivaron células HEK293T en poli-L-lisina en formato de 48 pocillos hasta una confluencia de 70-85% y se transfectaron utilizando Polietilenimina con los siguientes plásmidos: plásmido Psicheck2-3'UTR, expresión anormalmente alta de pre-mmu-miR-182 en plásmido pEGFP o plásmido pEGFP solo (clontech). 24 horas después de la transfección, se lisaron las células y se sometió a ensayo la actividad de los informadores de luciferasa como se ha descrito anteriormente [Chen A. et al. *Mol Endocrinol* (2005) 19:441-58]. Los valores de luciferasa de renilla se normalizaron para controlar los niveles de luciferasa de luciérnaga (transcritos a partir del mismo vector pero no afectados por las 3'UTR evaluadas) y se promediaron en seis repeticiones de pocillos por estado.

30

Derrota social crónica

35 Los ratones fueron sometidos a un protocolo de derrota social como se ha descrito anteriormente [Krishnan V. et al. *Cell* (2007) 131: 391-404]. Brevemente, los ratones se colocaron en una jaula de alojamiento de un ratón ICR agresivo e interactuaron físicamente durante cinco minutos. Durante este tiempo, el ratón ICR atacó al ratón intruso y el intruso mostró una postura subordinada. Después se colocaron separadores de plexiglás transparentes perforados entre los animales y los ratones permanecieron en la misma jaula durante 24 horas para permitir el contacto sensorial. Después se repitió el procedimiento con un ratón ICR desconocido durante cada uno de los siguientes 10 días.

40

Microdissección del núcleo del rafe y colecciones de plasma.

45 Las muestras de cerebro se tomaron de ratones en el núcleo del rafe (NR) después de extraer el cerebro y colocarlo en una matriz de acrílico del cerebro (Stoelting). Las rebanadas se tomaron utilizando cuchillas de afeitar convencionales (GEM) basadas en marcadores anatómicos designados. Se utilizaron jeringas 14G romas para extraer la región RN de secciones de 3 mm retiradas de la matriz.

50

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

Los ARNm, incluidos los microARN, se aislaron a partir de neuronas clasificadas, troqueles cerebrales congelados y plasma empleando miRNeasy mini kit (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se trataron utilizando miARN del kit de transcripción miScript Reverse para generar ADNc. Las muestras de ADNc se analizaron después utilizando el kit de PCR SYBR®Green (Qiagen) de acuerdo con las indicaciones del fabricante en el termociclador AB 7500 (Applied Biosystems). Se utilizaron cebadores específicos para cada miR junto con el cebador universal comercial, mientras que se utilizó ARNnp U6 como control interno.

55

Clonación de miR182 sobre el vector viral de expresión

60

Se amplificó Pre-miR-182 por PCR a partir de ADN genómico de ratón con cebadores que añadieron sitios de

enzimas de restricción Agel y después se introdujo Slc6a4 en el vector pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI). Después de la secuenciación de pGEM-T Easy y la digestión de pGEM-T Easy y el vector pEGFP (Clontech laboratories Inc., Mountain View, CA) con Agel, la secuencia de miR-182 prematura se ligó al vector pEGFP para construir el plásmido de expresión pEGFP-miR-182. Posteriormente, pmiR-182 se cortó con BamHI y BsrGI en paralelo para cortar el plásmido pCSC-E/Syn-eGFP con las mismas enzimas, y la secuencia de miR-182-eGFP se ligó a pCSC-E/Syn para construir el plásmido pCSC-eSNY-pre-miR-182-eGFP que se confirmó mediante análisis de endonucleasa de restricción y secuenciación de ADN.

Producción de vectores lentivirales.

Los lentivirus recombinantes se produjeron por transfección transitoria en células HEK293T, como se ha descrito anteriormente [Naldini L et al., Proc Natl Acad Sci U S A (1996) 93:11382-8]. Brevemente, los lentivirus infecciosos se recogieron a las 48 y 72 horas después de la transfección, se filtraron a través de filtros de acetato de celulosa de poros de 0,45 µm y se concentraron mediante ultracentrifugación.

Resultados

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

El análisis bioinformático de la 3'UTR de Htr1a como parte del análisis de micromatriz de miR de 5HT implicó una posible elección como diana de este gen por parte de miR-182. Por lo tanto, los autores de la presente invención realizaron pruebas *in vitro* a través de un ensayo de luciferasa, que reveló una fuerte represión de la 3'UTR de Htr1a por miR-182 (Figura 8). Aparecieron dos secuencias de emparejamiento de semilla conservadas para miR-182 en la 3'UTR de Htr1a de ratón.

Los estudios de regulación indicaron una fuerte tendencia a la regulación por disminución de los niveles de expresión de miR-182 en el NR de ratones adultos machos expuestos a una derrota social crónica en comparación con los controles (Figura 9), lo que sugiere una participación de miR-182 en la respuesta molecular al estímulo ambiental conocido para las comportamientos de tipo depresión inducidas.

Un análisis bioinformático adicional que generó predicciones de direccionamiento para miR-182 en dos bases de datos reveló una larga lista de dianas potenciales, incluidos los genes relacionados con la actividad neuronal tanto en condiciones normales como en condiciones patológicas (Figura 10).

Con el fin de evaluar adicionalmente miR-182 *in vitro* para la identificación de interacciones diana de miR específicas, y para revelar el papel de miR-182 en la regulación de comportamientos normales y patológicas *in vivo*, se desarrollaron sistemas plasmídicos y lentivirales para la manipulación de miR-182. Los lentivirus de expresión anormalmente alta específica neuronal se elaboraron (Figura 11A) y se evaluaron *in vitro* en la línea celular neuronal N2a. Estos resultados demostraron un aumento en los niveles de miR-182 en células infectadas con lentivirus de expresión anormalmente alta de miR-182 en comparación con el control (Figura 11B). La secuencia del plásmido modificado para reducir la expresión específica para miR-182 denominada miArrest (Genecopoeia, Rockville, MD, EE. UU., Figura 11C) se adquirió y se subclonó en construcciones virales (Figura 11C). Estos sistemas se evalúan en cultivo celular y mediante inyección específica en el sitio a cerebros de ratones adultos.

Se desarrollaron ratones nulos para miR-182 con el fin de investigar el papel de los miR en el desarrollo de la retina. Recientemente, los autores de la presente invención obtuvieron pares de cruzamiento para esta línea, y en una generación una colonia, miR-182 KO y sus compañeros de camada WT están siendo fenotipificados de manera conductual y fisiológica.

Ejemplo 5b

Regulación de los niveles de expresión de miR182 por estrés agudo.

Materiales y procedimientos experimentales

Como se ha descrito en el Ejemplo 5A, anteriormente

Resultados

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

Ensayo de interacción miR-diana para los genes diana pronosticados de miR182

Utilizando un ensayo de luciferasa, se examinaron once genes diana pronosticados de miR182, seleccionados después de un análisis bioinformático exhaustivo (Figura 27A). Las 3'UTR de los genes diana fueron evaluadas *in vitro* para verificar si miR182 tiene un efecto represor medido por la actividad del gen informador conjugado de luciferasa. De los once genes evaluados, tres genes: Dscam (Molécula de Adhesión Celular del Síndrome de Down), L1cam (Molécula de Adhesión Celular L1) y Tsnax (Proteína X Asociada a Translina) demostraron un efecto represor por miR182 como en el ensayo de luciferasa (Figura 27A). Al evaluar la 3'UTR del gen diana mencionado anteriormente de miR182, se observó una secuencia conservada de emparejamiento de semilla para miR182 en Tsnax, L1cam y Dscam, lo que sugiere que esta interacción miR-diana tenía un papel funcional (datos no mostrados).

A continuación, se verificó el efecto represor directo de miR182 sobre estos tres genes. Por lo tanto, las 3'UTR se mutaron para eliminar la secuencia de emparejamiento de semilla de miR182 y se compararon las 3'UTR regulares con las mutadas *in vitro* mediante ensayos de luciferasa. El efecto represor de miR182 sobre la 3'UTR de L1cam se eliminó cuando mutó su secuencia de apareamiento (Figura 27B), y de manera similar, el efecto de miR182 sobre Tsnax se eliminó en la 3'UTR mutada (Figura 27C), lo que indica que miR182 se eligió como diana directamente este gen. Se realizó una verificación similar para Dscam y Htr1a con la 3'UTR mutada.

Se utiliza un modelo de ratón que carece de miR182 para estudiar la interacción entre miR182 y sus genes diana *in vivo*. Los autores de la presente invención están examinando el fenotipo de comportamiento de los ratones miR182KO en pruebas de comportamiento social, aprendizaje y memoria, y comportamientos similares a la esquizofrenia.

Ejemplo 6

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

Materiales y procedimientos experimentales

Clonación de vectores virales de expresión anormalmente alta de miR135 y de vector viral de miR135 KD

El plásmido de miR135b KD pEZX-H1-miR135KD-CMV-mCherry y pEZX-H1-control KD-CMV-mCherry de control se adquirieron de GeneCopeia (EE.UU.). El promotor H1 y la secuencia KD se amplificaron utilizando cebadores con el sitio NheI flanqueante y se ligaron a pGEM-T Easy. Después de la secuenciación de pGEM-T Easy y la digestión de pGEM-T Easy y p156-pRRL-CMV-GFP con el sitio NheI, se ligaron H1-KD miR y p156 mellado para generar p156-pRRL-H1-miR135bKD-CMV-GFP y p156-pRRL-H1-control KD-CMV-GFP.

Evaluaciones de comportamiento

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

Prueba de transferencia de luz/oscuridad

El aparato de prueba de transferencia de luz/oscuridad y las condiciones experimentales fueron las que se han descrito anteriormente. Brevemente, el aparato contenía 2 cámaras, una cubierta oscura, en la que se colocaron los ratones al comienzo de la prueba, y una cámara iluminada, a la que se puede transferir libremente durante la prueba de 5 minutos. El tiempo pasado en el compartimento de luz, la distancia recorrida en iluminación, la latencia para visitar la cámara iluminada y el número de transiciones de luz-oscuridad se cuantificaron con un sistema de seguimiento de video (VideoMot2; TSE Systems, Bad Hamburg, Alemania).

Prueba de campo abierto

La prueba de campo abierto se realizó en una caja blanca de 50x50x22 cm, iluminada a 120 lux, en la que los ratones se colocaron para una prueba de 10 minutos. El tiempo invertido en el centro, el número de visitas en el centro, la latencia para visitar el centro, el número de exploraciones erguidas y la distancia total recorrida se cuantificaron utilizando un sistema de seguimiento de video (VideoMot2; TSE Systems, Bad Hamburg, Alemania).

Prueba de laberinto elevado en cruz

Este aparato de prueba tenía una forma en cruz y contenía 2 paredes de barrera y 2 brazos abiertos de muy baja iluminación (6 lux). La cantidad de entradas, la distancia recorrida y el tiempo que pasaron en los brazos abiertos se calificaron automáticamente utilizando el sistema de seguimiento de video (VideoMot2; TSE Systems, Bad Hamburg, Alemania) durante la prueba de 5 minutos.

Resultados

Los efectos de la administración de antidepresivos sobre los niveles de miR135 se evaluaron en sitios cerebrales que se sabe que están innervados por neuronas serotoninérgicas del NR e implicados en la regulación del estado de ánimo, la amígdala (AMY) y la corteza prefrontal (PFC). En la AMY, ambas variantes de miR135 estaban reguladas por incremento por los inhibidores agudos de la recaptación de serotonina (SSRI) y los inhibidores de la recaptación de noradrenalina (NRI), pero no por la administración crónica de estos fármacos ($P = 0,0001$ para SSRI, $p = 0,003$ para NRI para miR135a, Figura 28A; $p = 0,0001$ para SSRI y $p = 0,003$ para NRI para miR-135b, Figura 28B). En la PFC, los niveles de miR135b se regularizaron al alza mediante SSRI agudo y NRI ($P = 0,0183$ para SSRI y $0,0013$ para NRI Figura 28c) pero los niveles de miR135a no se alteraron significativamente (Figura 28D). Además, SSRI crónico condujo a una disminución de los niveles de miR135a y miR135b en el PFC ($P = 0,0241$ para miR135a Figura 28C, y $P = 0,0067$ para miR135b Figura 28D).

Además, los niveles de miR135 en la circulación se evaluaron siguiendo el paradigma de la derrota social. Los niveles de miR135a ($P = 0,0089$; Figura 29A) y miR135b ($P = 0,0033$; Figura 29B) aumentaron en el plasma de ratones expuestos a derrota social crónica en comparación con los ratones de control medidos en tiempo real mediante PCR. Por lo tanto, los resultados actuales demostraron que miR135 en plasma se reguló al alza después de estrés crónico, que se sabe que induce comportamientos similares a la depresión en ratones y se redujo en gran medida por la administración de antidepresivos. Estos hallazgos sugieren niveles de miR135 en el plasma como biomarcador para los estados depresivos relacionados con los receptores serotoninérgicos.

Ejemplo 7

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

Materiales y procedimientos experimentales

Clonación del vector viral miR135 KD

El plásmido de miR135b KD pEZX-H1-miR135KD-CMV-mCherry y pEZX-H1-control KD-CMV-mCherry de control se adquirieron de GeneCopeia (EE. UU.). El promotor H1 y la secuencia KD se amplificaron utilizando cebadores con el sitio NheI flanqueante y se ligaron a pGEM-T Easy. Después de la secuenciación de pGEM-T Easy y la digestión de pGEM-T Easy y p156-pRRL-CMV-GFP con el sitio NheI, se ligaron H1-KD miR y p156 mellado para generar p156-pRRL-H1-miR135bKD-CMV-GFP y p156-pRRL-H1-control KD-CMV-GFP.

Resultados

Para evaluar el efecto de la disminución de los niveles de miR135 en NR en los comportamientos relacionados con 5-HT de ratones, se utilizó un inhibidor de miR135b basado en el plásmido y se evaluó su eficacia en un ensayo de luciferasa. En este ensayo, las células HEK293T se co-transfectaron con los plásmidos miR135OE, miR135KD y 3'UTR, y se evaluó la capacidad del plásmido miR135bKD para bloquear el efecto de represión de miR135 en la 3'UTR de Slc6a4 y Htr1a. El efecto represor de miR135b de la 3'UTR de Htr1a fue bloqueado por el plásmido miR135KD (Figura 30A). De manera similar, el efecto de miR135b sobre la 3'UTR de Slc6a4 fue bloqueado por miR135KD (Figura 30B). Estos resultados indican que el plásmido miR135KD bloquea la actividad biológica de miR135.

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

Ejemplo 8**Efectos sobre el comportamiento de la reducción de la expresión de miR135 en NR de ratones adultos****5 Materiales y procedimientos experimentales****Evaluaciones de comportamiento**

10 los ratones se caracterizaron conductualmente mediante el uso de pruebas para la ansiedad y comportamientos similares a la depresión Como se ha descrito en el Ejemplo 6 anterior.

Resultados

15 Después de la validación *in vitro* e *in vivo* de los lentivirus miR135KD, estos se utilizaron para manipular los niveles de miR135 en el NR y para probar su efecto sobre el comportamiento de los ratones. A los ratones adultos se les inyectaron lentivirus miR135KD, o lentivirus de control KD en el NR y después del período de recuperación se evaluaron la ansiedad y comportamientos similares a la depresión. Puesto que miR135 reprime los reguladores negativos de 5-HT, los autores de la presente invención esperaban que miR135KD condujera a la disminución de los niveles de 5-HT en la sinapsis y, por ende, a un aumento de la ansiedad y de comportamientos similares a la depresión.

25 En la prueba de campo abierto no se observaron diferencias entre los grupos (Figura 31A), sin embargo, en la prueba de laberinto en cruz, los ratones miR135KD demostraron un mayor comportamiento similar a la ansiedad al demostrar una tendencia a pasar menos tiempo en los brazos abiertos ($P = 0,0644$) y visitar menos veces los brazos abiertos ($P = 0,0572$ Figura 31B). Además, los ratones miR135KD caminaron significativamente menos distancia en los brazos abiertos ($P = 0,0433$) y tuvieron una mayor tendencia a visitar los brazos abiertos ($P = 0,0124$ Figura 31B). De manera similar, en la prueba de luz-oscuridad realizada en condiciones de estrés basal, los ratones miR135KD demostraron un comportamiento similar a la ansiedad significativamente mayor en comparación con los controles al pasar menos tiempo a la luz ($P = 0,0454$ Figura 31C), visitando menos veces la cámara iluminada ($P = 0,0107$ Figura 31D) y caminar una distancia menor en la cámara iluminada ($P = 0,0402$ Figura 31E). Los resultados ilustraron una disminución en los niveles de miR135 40 min y 24 horas después del estrés agudo (Figura 30A-B), por lo tanto, la teoría actual fue que los ratones miR135KD estresados no diferirían de sus controles en comportamientos similares a la ansiedad cuando se evaluaron después del estrés agudo, ya que los ratones de control también tendrían una disminución de los niveles de miR135 debido al estrés. De hecho, no hubo diferencias entre los grupos cuando se volvió a realizar la prueba en la prueba de transferencia de luz-oscuridad en ninguno de los parámetros, ambos cuando se evaluaron 40 minutos o 24 horas después del estrés agudo (Figura 31C-E).

40 Las comportamientos depresivos de miR135KD se evaluaron tanto en condiciones basales como después de la manipulación farmacológica. Debido a que se demostró que los niveles de miR135 aumentaron en el NR después de la administración de SSRI (Figura 31E), se especuló que la reducción de los niveles de miR135 puede llevar a una respuesta reducida a SSRI. En la prueba de suspensión de cola realizada tanto a niveles basales como después de la administración de SSRI, no hubo diferencias entre los ratones KD miR135b y los ratones KD de control en el tiempo de inmovilidad (Figura 31F), y se observó la disminución esperada en el tiempo de inmovilidad debido al tratamiento con SSRI ($P < 0,0008$). Sin embargo, en la prueba de natación forzada, además del efecto principal para la inyección de SSRI ($P < 0,0001$), los ratones miR135KD a los que se había inyectado SSRI fueron más inmóviles los últimos 2 minutos de la prueba en comparación con los ratones KD de control ($P = 0,0141$ 5 minutos, $P = 0,0404$ 6 minutos; la Figura 31G sugiere una atenuación de los efectos antidepresivos de SSRI al reducir los niveles de miR135 en el NR. Este resultado implica que miR135 es parte de la alternancia endógena que conduce a cambios de comportamiento causados por SSRI.

50 Ejemplo 9**Expresión anormalmente alta de miR135 en neuronas 5-HT****55 Materiales y procedimientos experimentales**

Los ratones que expresaban de manera anormalmente alta miR135a en neuronas 5-HT se compararon con sus compañeros de camada de control en cuanto a los niveles de expresión de miR135 y en cuanto a sus genes diana y su comportamiento.

60 Resultados

Los efectos de la manipulación de los niveles de miR135 específicamente en las neuronas 5-HT en el NR de ratones se evaluaron para detectar comportamientos similares a la ansiedad y la depresión. Para ese propósito, se

desarrolló un sistema genético utilizando el sistema Cre-loxP. Específicamente, la especificidad de 5-HT se obtuvo utilizando los ratones ePet Cre que expresan la recombinasa Cre específicamente en las neuronas positivas para 5-HT NR y se llevó a cabo la expresión anormalmente alta de miR135 cruzando la línea de Cre específica de 5-HT (ePet Cre) con la línea de ratón transgénico con expresión anormalmente alta condicional para miR135a (Figura 32).

El nivel de expresión de miR135 en el NR de ratones que expresan de manera anormalmente alta miR135 específicamente en neuronas 5-HT (miR135OE) se evaluó mediante PCR en tiempo real para miR135 y se comparó con ratones de control, positivo para el alelo de expresión anormalmente alta condicional de miR135 pero negativo para ePet CRE. Los ratones miR135OE demostraron una expresión anormalmente alta cercana a 2 veces en comparación con los ratones de control (Figura 33A; $P < 0,05$). Los niveles de expresión anormalmente alta de miR135 fueron similares a los niveles medidos en el NR de ratones después de la administración de SSRI, lo que sugiere que esta línea de ratones fue un buen modelo para estudiar las características de los antidepresivos de miR135. Además, el ARNm del gen diana de miR135, Slc6a4 (Figura 33B; $P < 0,05$) y Htr1a (Figura 33C; $P < 0,1$) se regularon por disminución en el NR de los ratones miR135OE en comparación con el control, lo que demuestra represión *in vivo* por miR135 de sus genes diana.

Para probar la expresión anormalmente alta de miR135 específicamente en las neuronas 5-HT, los ratones miR135OE y sus compañeros de camada de control fueron expuestos a un paradigma de derrota social crónica, un procedimiento conocido para inducir comportamientos similares a depresión y a ansiedad, y posteriormente se evaluaron para detectar comportamientos similares a ansiedad y a depresión.

Los ratones miR135OE demostraron comportamientos similares a ansiedad después de la derrota social en comparación con los compañeros de camada de control. En campo abierto, se observó una tendencia al aumento de la ansiedad en el tiempo en los ratones miR135OE y el número de visitas al centro ($P < 0,1$, Figura 34A). Mientras estaba en la prueba de transferencia de luz-oscuridad, los ratones miR135OE pasaron más tiempo a la luz ($P < 0,05$, Figura 34B) y pasaron menos tiempo en la cámara iluminada ($P < 0,01$, Figura 34B). Se observaron resultados similares en el laberinto de elevado en cruz ($P < 0,05$, Figura 34B) mientras que los ratones miR135OE pasaron más tiempo en los brazos abiertos ($P < 0,05$, Figura 34C) y viajaron una mayor distancia en los brazos abiertos ($P < 0,05$, Figura 34C).

Los comportamientos depresivos de los ratones miR135OE después de la derrota social fueron menores que en los compañeros de camada de control. Se observó una tendencia hacia la disminución del tiempo de inmovilidad de los ratones miR135OE en comparación con los controles en la prueba de suspensión de cola ($P < 0,1$, Figura 34D), junto con una disminución significativa del tiempo de inmovilidad en la prueba de natación forzada ($P < 0,05$, Figura 34E).

LISTA DE SECUENCIAS

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

<120> MICRO-RNAS Y COMPOSICIONES QUE COMPRENEN EL MISMO PARA EL TRATAMIENTO Y DIAGNÓSTICO DE AFECCIONES MÉDICAS ASOCIADAS A SEROTONINA, ADRENALINA, NORADRENALINA, GLUTAMATO Y HORMONA LIBERADORA DE CORTICOTROPINA

<130> 54322

<150> US 61/514,954

<151> 2011-08-04

<160> 157

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 1

tatggctttt tattcctatg tga

23

<210> 2
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 2
 10 tatggctttt cattcctatg tga 23
 <210> 3
 <211> 22
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 3
 20 ttgttcgtt cggctcgcgt ga 22
 <210> 4
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 4
 30 gatgacacgc aaattcgtga a 21
 <210> 5
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 5
 taaggcacgc ggtgaatgcc 20
 <210> 6
 <211> 19
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 6
 55 agttctgccg ctgatgatg 19
 <210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 <223> oligonucleótido de ADN monocatenario
 <400> 7

gcacaaatgg agagtctgat taaa 24

<210> 8
<211> 20
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido de ADN monocatenario

10 <400> 8
tgccttaat gcaaaacagc 20

<210> 9
15 <211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
20 <223> oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 9
ccaagtttac aaccatcaag ca 22

25 <210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 10
35 atccgcatga atgctgtgta 20

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 11
45 gtgggtggtg gaagagacac 20

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido de ADN monocatenario

55 <400> 12
cctacacgca gagcattgaa 20

<210> 13
<211> 20
60 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> oligonucleótido de ADN monocatenario

	<400> 13 acatccctgt gggatttgag	20	
5	<210> 14 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
10	<220> <223> oligonucleótido de ADN monocatenario		
	<400> 14 tgtcttgctt atatttctc agtag	25	
15	<210> 15 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
20	<220> <223> oligonucleótido de ADN monocatenario		
25	<400> 15 gaaaatataa gcaagacatc cctgtt	26	
30	<210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
35	<220> <223> oligonucleótido de ADN monocatenario		
	<400> 16 aaagatccct ttcccaatg	20	
40	<210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
45	<220> <223> oligonucleótido de ADN monocatenario		
	<400> 17 cagtgcgtct tctccacaga	20	
50	<210> 18 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
55	<220> <223> oligonucleótido de ADN monocatenario		
	<400> 18 ataagcaagg gcccaaaagg aaga	24	
60	<210> 19 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220>		

<223> oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 19
 5 ttttgggcc ttgctataa gtcc 24

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

10 <220>
 <223> oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 20
 15 ctgccctgcc acatgtgtt ttat 24

<210> 21
 <211> 24
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 21
 25 taacaaataa aaacacatgt ggca 24

<210> 22
 <211> 32
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> oligonucleótido de ADN monocatenario

35 <400> 22
 accggtcata tgattcccca gtttctgct tt 32

<210> 23
 40 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 45 <223> oligonucleótido de ADN monocatenario

<400> 23
 accggtcctc tgggctggt ccttag 26

<210> 24
 50 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Mus musculus

<400> 24
 55 aguguauccu uauuuuucgg uau 23

<210> 25
 <211> 23
 60 <212> ARN
 <213> Mus musculus

<400> 25
 acaggaugu cuugcuagcc aua 23

	<210> 26	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Mus musculus	
5		
	<400> 26	
	aguguauccu uacuuuucgg uau	23
10		
	<210> 27	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Mus musculus	
15		
	<400> 27	
	cugcccugcc acaugaagcc auu	23
20		
	<210> 28	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Mus musculus	
	<400> 28	
	cuugcuagcc auauauuuu u	21
25		
	<210> 29	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
30		
	<400> 29	
	uuucuauagc cauacucgcu	20
35		
	<210> 30	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Pan troglodytes	
40		
	<400> 30	
	cucgcuagcc auauauuuuc	20
45		
	<210> 31	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Rattus norvegicus	
	<400> 31	
	agccauacuu gcuauauuu u	21
50		
	<210> 32	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Cavia porcellus	
55		
	<400> 32	
	cuugcuagcc auauauuuuc	20
60		
	<210> 33	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Suncus murinus	
	<400> 33	
	cuugcuagcc auauauuuuc	20

	<210> 34	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Atelerix albiventris	
5		
	<400> 34	
	cucacuagcc auauauuuuu	20
	<210> 35	
10	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Canis lupus familiaris	
	<400> 35	
15	uuugcuagcc auauauuuuc	20
	<210> 36	
	<211> 20	
	<212> ARN	
20	<213> felis catus	
	<400> 36	
	uuugcuagcc auauauuuuc	20
25	<210> 37	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Equus caballus	
30	<400> 37	
	cuugcuagcc auauauuuuc	20
	<210> 38	
	<211> 19	
35	<212> ARN	
	<213> Bos taurus	
	<400> 38	
40	cuugcuagcc auauguuuu	19
	<210> 39	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Monodelphis domestica	
45	<400> 39	
	ucggauagcc auauauucuc	20
	<210> 40	
	<211> 20	
50	<212> ARN	
	<213> Ornithorhynchus anatinus	
	<400> 40	
55	ucugauagcc auauauuauuc	20
	<210> 41	
	<211> 20	
	<212> ARN	
60	<213> Gallus	
	<400> 41	
	uccauagcc auauauuacu	20

	<210> 42	
	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> Mus musculus	
5		
	<400> 42	
	uuauaagcaa gaagccaggc cc	22
10		
	<210> 43	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Mus musculus	
15		
	<400> 43	
	gccacaugaa gccauguuu u	21
20		
	<210> 44	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Rattus norvegicus	
	<400> 44	
	gucacaugaa gccauuuuu	20
25		
	<210> 45	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Cavia porcellus	
30		
	<400> 45	
	agcacuugaa gccauuguau	20
35		
	<210> 46	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Oryctolagus cuniculus	
40		
	<400> 46	
	aucacuugaa gccauuuuuau	20
45		
	<210> 47	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 47	
	gucaguugaa gccauuuuuau	20
50		
	<210> 48	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Pan troglodytes	
55		
	<400> 48	
	gucacuugaa gccauuuuuau	20
60		
	<210> 49	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Macaca mulata	
	<400> 49	
	gucacuugaa gccauuuuuau	19

	<210> 50	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Atelerix albiventris	
5		
	<400> 50	
	auuacuugaa gccauuuuau	20
	<210> 51	
10	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Canis lupus familiaris	
	<400> 51	
15	aucacugagc cauuuuuac	19
	<210> 52	
	<211> 20	
	<212> ARN	
20	<213> felis catus	
	<400> 52	
	uauacugaa gccauuuuau	20
25	<210> 53	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Equus caballus	
30	<400> 53	
	ucacuugaag ccauuuuau	19
	<210> 54	
	<211> 18	
35	<212> ARN	
	<213> Loxodonta africana	
	<400> 54	
	aucacugaag ccauuuuu	18
40	<210> 55	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Mus musculus	
45	<400> 55	
	uggaaagccc ugccuugcug cuu	23
	<210> 56	
50	<211> 22	
	<212> ARN	
	<213> Mus musculus	
	<400> 56	
55	guguuuggua auacacgacg au	22
	<210> 57	
	<211> 22	
	<212> ARN	
60	<213> Mus musculus	
	<400> 57	
	acauuuggua cuacacgacg au	22

ES 2 732 427 T3

	<210> 58		
	<211> 90		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
5	<400> 58		
	agggcucgcu guucucuaug gcuuuuuuuu ccuaugugau ucuacugcuc acucauuuag	60	
	ggauugggagc cguggcgcac ggcggggaca	90	
10	<210> 59		
	<211> 100		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
15	<400> 59		
	agauaaaauuc acucuagugc uuuauggcuu uuuaauccua ugugauagua auaaagucuc	60	
	auguagggau ggaagccaug aaauacauug ugaaaaauca	100	
20	<210> 60		
	<211> 97		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 60		
25	cacucugcug ugGCCuaugG cuuuucauuc cuaugugauu gcugucccaa acucauguag	60	
	ggcuaaaagc caugggcuac agugaggggc gagcucc	97	
30	<210> 61		
	<211> 23		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 61		
35	uauggcuuuu uauuccuaug uga	23	
	<210> 62		
	<211> 23		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
40	<400> 62		
	uauggcuuuu cauuccuaug uga	23	
45	<210> 63		
	<211> 94		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 63		
50	uguuuugagc gggggucaag agcaauaacg aaaauguuu gucauaaacc guuuuucauu	60	
	auugcuccug accuccucuc auuugcuaua uuca	94	
55	<210> 64		
	<211> 23		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		

ES 2 732 427 T3

	<400> 64		
	ucaagagcaa uaacgaaaa ugu	23	
	<210> 65		
5	<211> 77		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 65		
10	guggccucgu ucaaguaauc caggauaggc ugugcagguc ccaaugggcc uauucuuggu	60	
	uacuugcacg gggacgc	77	
	<210> 66		
	<211> 84		
15	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 66		
	ggcugugguu ggauucaagu aauccaggau aggcuguuuc caucugugag gccuauucuu	60	
20	gauuacuugu uucuggaggc agcu	84	
	<210> 67		
	<211> 77		
	<212> ARN		
25	<213> Homo sapiens		
	<400> 67		
	ccgggaccca guucaaguaa uucaggauag guugugugcu guccagccug uucuccauua	60	
	cuuggcucgg ggaccgg	77	
30	<210> 68		
	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
35	<400> 68		
	uucaaguaau ccaggauagg cu	22	
	<210> 69		
40	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 69		
45	uucaaguaau ucaggauagg u	21	
	<210> 70		
	<211> 110		
	<212> ARN		
50	<213> Homo sapiens		
	<400> 70		
	gagcugcuug ccucggggcg uuuuuggcaa ugguagaacu cacacuggug agguaacagg	60	
	auccgguggu ucuagacuug ccaacuaugg ggcgaggacu cagccggcac	110	
55	<210> 71		
	<211> 25		

	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 71	
5	uuuggcaaug guagaacuca caccg	25
	<210> 72	
	<211> 82	
	<212> ARN	
10	<213> Homo sapiens	
	<400> 72	
	gcaguccucu guuaguuuug cauaguugca cuacaagaag aauguaguug ugcaaaucua	60
	ugcaaaacug augguggccu gc	82
15	<210> 73	
	<211> 87	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
20	<400> 73	
	cacuguucua ugguuaguuu ugcagguuug cauccagcug ugugauauuc ugcugugcaa	60
	auccaugcaa aacugacugu gguagug	87
25	<210> 74	
	<211> 96	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
30	<400> 74	
	acauugcuac uuacaauuag uuuugcaggu uugcauuuca gcguauauau guauaugugg	60
	cugugcaaa uccaugcaaaa cugauuguga uaaugu	96
35	<210> 75	
	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
40	<400> 75	
	ugugcaaauc uaugcaaaac uga	23
	<210> 76	
	<211> 23	
45	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 76	
	ugugcaaauc caugcaaaac uga	23
50	<210> 77	
	<211> 83	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
55	<400> 77	
	ccuuggagua aaguagcagc acauaauggu uuguggauuu ugaaaaggug caggccauau	60
	ugugcugccu caaaaauaca agg	83

ES 2 732 427 T3

	<210> 78		
	<211> 98		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
5	<400> 78		
	uugaggccuu aaaguacugu agcagcacau caugguuuac augcuacagu caagaugcga		60
	aucuuuuuu gcugcucuag aaauuaagg aaauucau		98
10	<210> 79		
	<211> 22		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
15	<400> 79		
	uagcagcaca uaaugguuug ug	22	
	<210> 80		
	<211> 22		
20	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 80		
	uagcagcaca ucaugguuuu ca	22	
25	<210> 81		
	<211> 78		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
30	<400> 81		
	cugaggagca gggcuuagcu gcuugugagc aggguccaca ccaagucgug uucacagugg		60
	cuaaguuccg cccccag		78
35	<210> 82		
	<211> 97		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
40	<400> 82		
	accucucuaa caaggugcag agcuuagcug auuggugaac agugauuggu uuccgcuuug		60
	uucacagugg cuaaguucug caccugaaga gaaggug		97
	<210> 83		
45	<211> 21		
	<212> ARN		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 83		
50	uucacagugg cuaaguuccg c	21	
	<210> 84		
	<211> 21		
	<212> ARN		
55	<213> Homo sapiens		
	<400> 84		
	uucacagugg cuaaguucug c	21	

	<210> 85	
	<211> 110	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
5	<400> 85	
	ugaguuuuga gguugcuuca gugaacauuc aacgcugucg gugaguuugg aaauaaaauc	60
	aaaaccaucg accguugauu guaccuauug gcuaaccauc aucuacucca	110
10	<210> 86	
	<211> 110	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
15	<400> 86	
	agaagggcua ucaggccagc cuucagagga cuccaaggaa cauucaacgc ugucggugag	60
	uuugggauuu gaaaaaacca cugaccguug acuguaccuu gggguccuua	110
20	<210> 87	
	<211> 110	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 87	
25	ccugugcaga gauuauuuuu uaaaagguca caaucaacau ucauugcugu cggugggguug	60
	aacugugugg acaagcucac ugaacaauga augcaacugu ggccccgcuu	110
30	<210> 88	
	<211> 89	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 88	
	cugauggcug cacucaacau ucauugcugu cggugggguu gagucugaau caacucacug	60
35	aucaaugaau gcaaacugcg gaccaaaca	89
40	<210> 89	
	<211> 110	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 89	
	cggaaaauuu gccaaagguu ugggggaaca uucaaccugu cggugaguuu gggcagcuca	60
45	ggcaaaccuau cgaccguuga guggaccug aggccuggaa uugccauccu	110
50	<210> 90	
	<211> 137	
	<212> ARN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 90	

ES 2 732 427 T3

	gucccccuccc cuaggccaca gccgagguca caaucaacau ucauuguugu cgguggguug	60
	ugaggacuga ggccagaccc accgggggau gaaugucacu guggcugggc cagacacggc	120
	uuaaggggaa uggggac	137
5	<210> 91 <211> 23 <212> ARN <213> Homo sapiens	
10	<400> 91 aacauucaac gcugucggug agu 23	
15	<210> 92 <211> 23 <212> ARN <213> Homo sapiens	
20	<400> 92 aacauucauu gcugucggug ggu 23	
25	<210> 93 <211> 22 <212> ARN <213> Homo sapiens	
30	<400> 93 aacauucaac cugucgguga gu 22	
35	<210> 94 <211> 23 <212> ARN <213> Homo sapiens	
40	<400> 94 aacauucauu guugucggug ggu 23	
45	<210> 95 <211> 25 <212> ARN <213> Mus musculus	
50	<400> 95 ugaccaccug cugcugcggg ggggu 25	
55	<210> 96 <211> 26 <212> ARN <213> Oryctolagus cuniculus	
60	<400> 96 cagccacccu gcugcugccc aguggg 26	
	<210> 97 <211> 26 <212> ARN <213> Homo sapiens	
	<400> 97 cagccccccu gcugcugccc ggaggg 26	
	<210> 98 <211> 26	

<212> ARN
 <213> Pan troglodytes

 <400> 98
 5 cagccccccu gcugcugccc ggaggg 26

 <210> 99
 <211> 26
 <212> ARN
 10 <213> Macaca mulata

 <400> 99
 cagccccccu gcugcugccc agaggg 26

 15 <210> 100
 <211> 26
 <212> ARN
 <213> Otolemur garnettii

 20 <400> 100
 cagccacccu gcugcugccc agugag 26

 <210> 101
 <211> 26
 25 <212> ARN
 <213> Atelerix albiventris

 <400> 101
 30 ccaccacccu gcugcugccc agagcu 26

 <210> 102
 <211> 26
 <212> ARN
 35 <213> Canis lupus familiaris

 <400> 102
 cagccacccu gcugcugccc agcgug 26

 <210> 103
 40 <211> 26
 <212> ARN
 <213> Equus caballus

 <400> 103
 45 cagccacccu gcugcugccc agugcu 26

 <210> 104
 <211> 25
 <212> ARN
 50 <213> Bos taurus

 <400> 104
 caccacccug cugcugccca gaggu 25

 55 <210> 105
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Dasypus novemcinctus

 60 <400> 105
 aagcaaccug cugcugccca gcaca 25

 <210> 106
 <211> 26

<212> ARN
 <213> *Loxodonta africana*

 <400> 106
 5 caaccacccu gcugcugccc agugca 26

 <210> 107
 <211> 25
 <212> ARN
 10 <213> *Echinops telfairi*

 <400> 107
 caucccccug cugcugccca gcaca 25

 15 <210> 108
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> *Monodelphis domestica*

 20 <400> 108
 uagccccug cugcuacca uugcc 25

 <210> 109
 <211> 26
 25 <212> ARN
 <213> *Gallus gallus*

 <400> 109
 ccagcccagu gcugcugccg gcugcg 26

 30 <210> 110
 <211> 143
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR135

 <400> 110
 40 gacggcgcta ggatcatcaa ctcacatagg aatgatctaa aagccataca agtattctgg 60

 tcacagaata caactcacat aggaatgatc taaaagccat acaagatgat cctagcgccg 120

 tcttttttga attcgcggcc cta 143

 <210> 111
 <211> 105
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR135

 50 <400> 111

 tcacatagga atgaaaagcc atacgattca cataggaatg aaaagccata accggtcaca 60

 taggaatgaa aagccatatc actcacatag gaatgaaaag ccata 105

 55 <210> 112
 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 732 427 T3

<220>
 <223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR135 - construcción antisentido (directa)

<400> 112

5 tcacatagga agcaaagcca taatcgtcac ataggaagca aagccataat cgtcacatag 60

 gaagcaaagc cataatcgtc acataggaag caaagccata 100

<210> 113
 <211> 100
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR135 - construcción antisentido (inversa)

15 <400> 113

 tatggctttg cttcctatgt gacgattatg gctttgcttc ctatgtgacg attatggctt 60

 tgcttcctat gtgacgatta tggctttgct tcctatgtga 100

20 <210> 114
 <211> 143
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR335 5p

 <400> 114

 gacggcgcta ggatcatcaa cacatttttc gttaatcttt gctcttgaca agtattctgg 60

 tcacagaata caacacattt ttcgttaatc tttgctcttg acaagatgat cctagcgccg 120

30 tcttttttga attcgcggcc cta 143

<210> 115
 <211> 105
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR335 5p

40 <400> 115

 acattttttcg ttattgctct tgacgatata tttttcgtta ttgctcttga accggacatt 60

 tttcgttatt gctcttgatc acacattttt cgttattgct cttga 105

<210> 116
 45 <211> 100
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 50 <223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR335-5p - construcción antisentido (directa)

 <400> 116

ES 2 732 427 T3

	acattttttcg agctgctctt gaatcgacat ttttcgagct gctcttgaat cgacattttt	60
	cgagctgctc ttgaatcgac atttttcgag ctgctcttga	100
5	<210> 117 <211> 100 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR335-5p - construcción antisentido (inversa) <400> 117	
	tcaagagcag ctcgaaaaat gtcgattcaa gagcagctcg aaaaatgtcg attcaagagc	60
	agctcgaaaa atgtcgattc aagagcagct cgaaaaatgt	100
15	<210> 118 <211> 141 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR15a <400> 118	
	gacggcgcta ggatcatcaa ccacaaacca ttaatcttgt gctgctacaa gtattctggt	60
	cacagaatac aaccacaaac cattaatctt gtgctgctac aagatgatcc tagcgccgctc	120
25	ttttttgaat tcgcgccct a	141
30	<210> 119 <211> 101 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR15a <400> 119	
	cacaaaccat tatgtgctgc tacgatcaca aaccattatg tgctgctaac cggcacaaac	60
40	cattatgtgc tgctatcacc acaaaccatt atgtgctgct a	101
45	<210> 120 <211> 96 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR15a - construcción antisentido (directa) <400> 120	
	cacaaaccaa gcgtgctgct aatcgacaaa accaagcgtg ctgctaatacg cacaaaccaa	60
	gcgtgctgct aatcgacaaa accaagcgtg ctgcta	96
55	<210> 121 <211> 96 <212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR15a - construcción antisentido (inversa)	
5	<400> 121	
	tagcagcacg cttggtttgt gcgattagca gcacgcttgg tttgtgcgat tagcagcacg	60
	cttgggtttgt gcgattagca gcacgcttgg tttgtg	96
10	<210> 122	
	<211> 143	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR19	
	<400> 122	
	gacggcgcta ggatcatcaa ctcagttttg catgatctga tttgcacaca agtattcttg	60
	tcacagaata caactcagtt ttgcatgatc tgatttgcac acaagatgat cctagcgccg	120
20	tctttttttga attcgcggcc cta	143
	<210> 123	
	<211> 105	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR19	
30	<400> 123	
	tcagtttttg atggatttgc acacgattca gttttgcatg gatttgcaca accggtcagt	60
	tttgcattgga tttgcacatc actcagtttt gcatggattt gcaca	105
	<210> 124	
35	<211> 100	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR19 - construcción antisentido (directa)	
	<400> 124	
	tcagtttttg atgatttgc caatcgtcag ttttgcattga tttgcacaat cgtcagtttt	60
	gcatgatttg cacaatcgtc agttttgcat gatttgcaca	100
45	<210> 125	
	<211> 97	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR19 - construcción antisentido (directa)	

ES 2 732 427 T3

	<400> 125		
	tgtgcaaatc atgcaaaact gacgattgtg caaatcatgc aaaactgcga ttgtgcaaat	60	
	catgcaaaac tgcgattgtg caaatcatgc aaaactg	97	
	<210> 126		
	<211> 141		
5	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR26		
	<400> 126		
	gacggcgcta ggatcatcaa cagcctatcc tggatctatt acttgaacaa gtattctggt	60	
	cacagaatac aacagcctat cctggatcta ttacttgaac aagatgatcc tagcgccgtc	120	
	ttttttgaat tcgcgccct a	141	
15	<210> 127		
	<211> 101		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR26		
	<400> 127		
	agcctatcct ggattacttg aacgatagcc tatcctggat tacttgaaac cggagcctat	60	
25	cctggattac ttgaatcaca gcctatcctg gattacttga a	101	
	<210> 128		
	<211> 96		
	<212> ADN		
30	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR26 - construcción antisentido (directa)		
35	<400> 128		
	agcctatcct ggttacttga aatcgagcct atcctgggta cttgaaatcg agcctatcct	60	
	ggttacttga aatcgagcct atcctgggta cttgaa	96	
	<210> 129		
40	<211> 96		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
45	<223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR26 - construcción antisentido (inversa)		
	<400> 129		
	ttcaagtaac caggataggc tcgatttcaa gtaaccagga taggctcgat ttcaagtaac	60	
	caggataggc tcgatttcaa gtaaccagga taggct	96	
50	<210> 130		
	<211> 140		

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR27

<400> 130

gacggcgcta ggatcatcaa ctgctcacia gcaatctgct aagccctcaa gtattctggt 60

cacagaatac aactgctcac aagcaatctg ctaagcccta agatgaccc agcgccgtct 120

10 tttttgaatt cgcggcccta 140

<210> 131
<211> 101
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR27

<400> 131

20 tgctcacaag cagctaagcc ctcgattgct cacaagcagc taagccctac cgggtgctcac 60

aagcagctaa gcccttcact gctcacaagc agctaagccc t 101

<210> 132
<211> 92
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR27a - construcción antisentido (directa)

30 <400> 132

gcggaactta gcactgtgaa atcggcgga cttagcactg tgaaatcggc ggaacttagc 60

actgtgaaat cggcggaact tagcactgtg aa 92

35 <210> 133
<211> 92
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR27a - construcción antisentido (inversa)

<400> 133

ttcacagtgc taagtccgc cgatttcaca gtgctaagtt ccgccgattt cacagtgcta 60

45 agttccgccg atttcacagt gctaagttcc gc 92

<210> 134
<211> 141
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR181

55 <400> 134

ES 2 732 427 T3

	gacggcgcta ggatcatcaa cactcaccga cagatctgtt gaatgttcaa gtattctggt	60
	cacagaatac aacactcacc gacagatctg ttgaatgttc aagatgatcc tagcgccgtc	120
	ttttttgaat tcgcgccct a	141
5	<210> 135 <211> 101 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR181 <400> 135	
	actcaccgac aggttgaatg ttcgatactc accgacaggt tgaatgttac cggactcacc	60
	gacaggttga atgtttcaca ctcaccgaca ggttgaatgt t	101
15	<210> 136 <211> 100 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR181d - construcción antisentido (directa) <400> 136	
	acccaccgac agcatgaatg ttatcgaccc accgacagca tgaatgttat cgaccacccg	60
25	acagcatgaa tgttatcgac ccaccgacag catgaatggt	100
30	<210> 137 <211> 102 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR181d - construcción antisentido (inversa) <400> 137	
	aacattcatg ctgtcgggtg gtcgataaca ttcatgctgt cgggtgggtac gataacattc	60
	atgctgtcgg tgggtcgatt aacattcatg ctgtcgggtg gt	102
40	<210> 138 <211> 147 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR182 <400> 138	
	gacggcgcta ggatcatcaa ccggtgtgag ttctacatct cattgccaaa caagtattct	60
	ggtcacagaa tacaaccggt gtgagttcta catctcattg ccaaacaaga tgatcctagc	120
50	gccgtctttt ttgaattcgc ggcccta	147
	<210> 139	

<211> 113
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR182

<400> 139

cgggtgtgagt tctaccattg ccaaacgatc ggtgtgagtt ctaccattgc caaaaccggc 60
 10 ggtgtgagtt ctaccattgc caaatcaccg gtgtgagttc taccattgcc aaa 113

<210> 140
 <211> 108
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR182 - construcción antisentido (directa)

20 <400> 140

cgggtgtgagt tagccattgc caaaatcgcg gtgtgagtta gccattgcc aaatcgcggt 60
 gtgagttagc cattgccaaa atcgcggtgt gagttagcca ttgcaaaa 108

<210> 141
 25 <211> 108
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 30 <223> Secuencia modificada para reducir la expresión de miR182 - construcción antisentido (inversa)

<400> 141

tttggcaatg gctaactcac accgcgattt tggcaatggc taactcacac cgcgattttg 60
 gcaatggcta actcacaccg cgattttggc aatgggtaac tcacaccg 108

35

<210> 142
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

40

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

<400> 142
 45 ucacauagga auaaaaagcc aua 23

<210> 143
 <211> 23
 <212> ARN
 50 <213> Secuencia artificial

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

<400> 143
 55 ucacauagga augaaaagcc aua 23

<210> 144
 <211> 23

<212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido anti miR-335

 <400> 144
 acauuuuucg uuauugcucu uga 23

 10 <210> 145
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> oligonucleótido anti miR-26a

 <400> 145
 20 agccuauccu ggauuacuug aa 22

 <210> 146
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> oligonucleótido anti miR-26b

 <400> 146
 30 accuauccug aauuacuuga a 21

 <210> 147
 <211> 25
 <212> ARN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido anti miR-182

 40 <400> 147
 cggugugagu ucuaccuug ccaaa 25

 <210> 148
 <211> 23
 45 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> oligonucleótido anti miR-19a
 50
 <400> 148
 ucaguuuugc auagauuugc aca 23

 <210> 149
 55 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> oligonucleótido anti miR-19b

 <400> 149
 ucaguuuugc auggauuugc aca 23

<210> 150
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> oligonucleótido anti miR-15a
 <400> 150
 10 cacaaaccu uaugugcugc ua 22
 <210> 151
 <211> 22
 <212> ARN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido anti miR-15b
 20 <400> 151
 uguaaaaccu gaugugcugc ua 22
 <210> 152
 <211> 21
 25 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido anti miR-27a
 30 <400> 152
 gcggaacuua gccacuguga a 21
 <210> 153
 <211> 21
 35 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> oligonucleótido anti miR-27b
 <400> 153
 gcagaacuua gccacuguga a 21
 <210> 154
 <211> 23
 45 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> oligonucleótido anti miR-181a
 <400> 154
 55 acucaccgac agcguugaau guu 23
 <210> 155
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> oligonucleótido anti miR-181b
 <400> 155

acccaccgac agcaaugaau guu 23
 <210> 156
 <211> 22
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido anti miR-181c
 10 <400> 156
 acucaccgac agguugaaug uu 22
 <210> 157
 15 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> oligonucleótido anti miR-181d
 <400> 157
 acccaccgac aacaaugaau guu 23
 25

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un miR-15, un precursor del mismo, o un polinucleótido exógeno que codifica dicho miR-15 o dicho precursor del mismo, para su uso en el tratamiento de una afección médica seleccionada del grupo que consiste en depresión, ansiedad, deterioro de la función cognitiva, ataque de pánico, comportamiento compulsivo, adicción, fobia social, trastorno del sueño, trastorno relacionado con la alimentación, trastorno del crecimiento y trastorno reproductivo.
- 10 2. Una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el miR-15 o el precursor del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, estando dicha secuencia de ácido nucleico bajo el control transcripcional de un elemento regulador que actúa en cis.
- 15 3. Una composición farmacéutica que comprende la construcción de ácido nucleico para su uso de acuerdo con la reivindicación 2 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptables.
- 20 4. Una célula aislada que comprende una construcción de ácido nucleico que expresa el miR-15 o el precursor del mismo bajo el control transcripcional de un elemento regulador que actúa en cis para su uso de acuerdo con la reivindicación 1.
- 25 5. La célula aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicha célula es una célula glial.
- 30 6. La construcción de ácido nucleico para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, o la célula aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho elemento regulador que actúa en cis es activo en una célula glial o una célula cardíaca.
- 35 7. El miR-15 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, la construcción de ácido nucleico para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, o una célula aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho miR-15 es el expuesto en SEQ ID NO: 77-80.
- 40 8. El miR-15 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, la construcción de ácido nucleico para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, o una célula aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho miR-15 comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en un esqueleto modificado, un enlace internucleosídico modificado y una base modificada.
- 45 9. El miR-15 para su uso, la construcción de ácido nucleico, para su uso o célula aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde dicho esqueleto modificado comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en un fosforotioato, un fosforotioato quiral, un fosforoditioato, un fosfotriéster, y aminoalquil fosfotriéster, un metil fosfonato, un alquil fosfonato, un fosfonato quiral, un fosfinato, un fosforamidato, un aminoalquilfosforamidato, un tionofosforamidato, un tionoalquilfosfonato, un tionoalquilfosfotriéster, un boranofosfato, un fosfodiéster, un ácido peptidonucleico (PNA) y un 2'-O-metoxietilo.
10. El miR-15 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, la construcción de ácido nucleico para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, o una célula aislada para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho miR-15 comprende una modificación tanto en un azúcar como en un enlace internucleosídico.

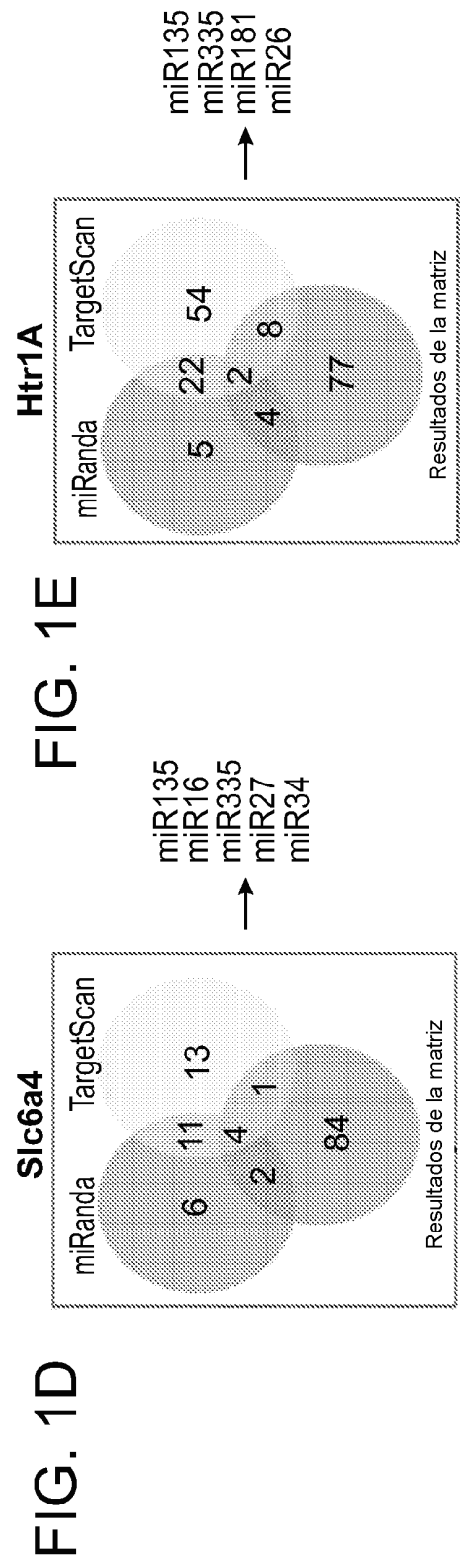
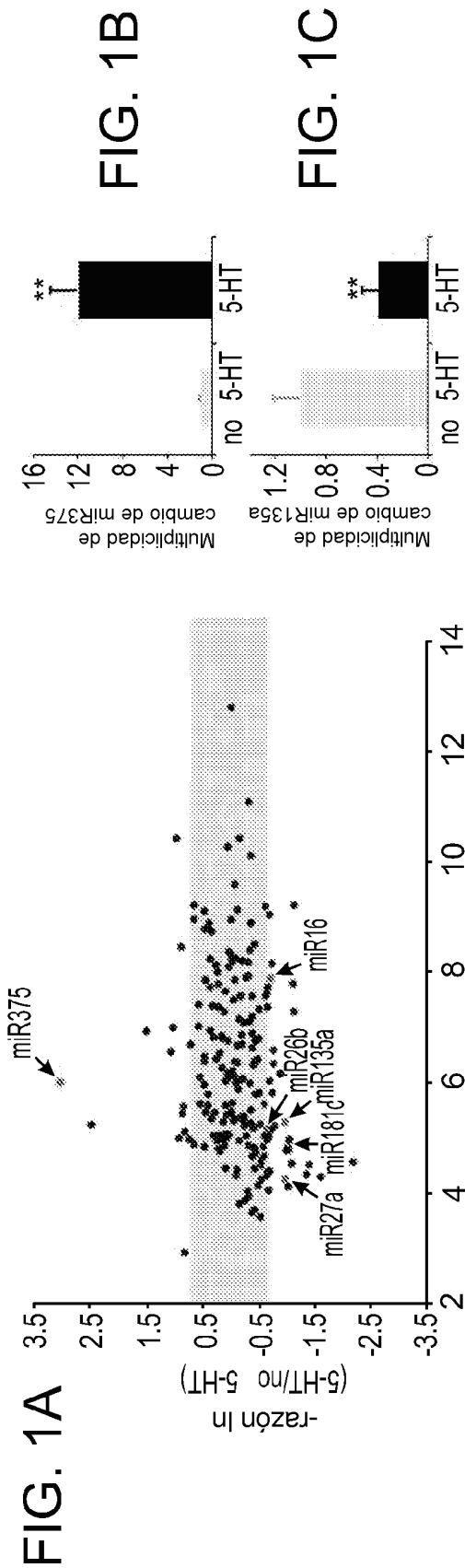


FIG. 1F Tph2

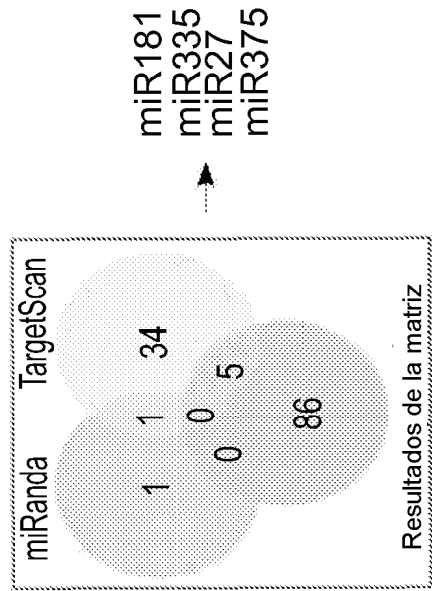


FIG. 1G MaoA

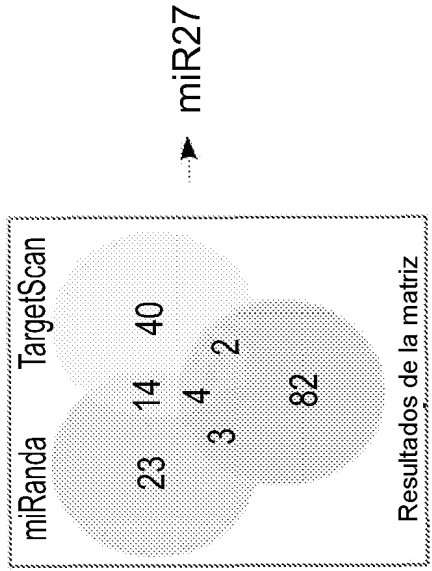


FIG. 1H

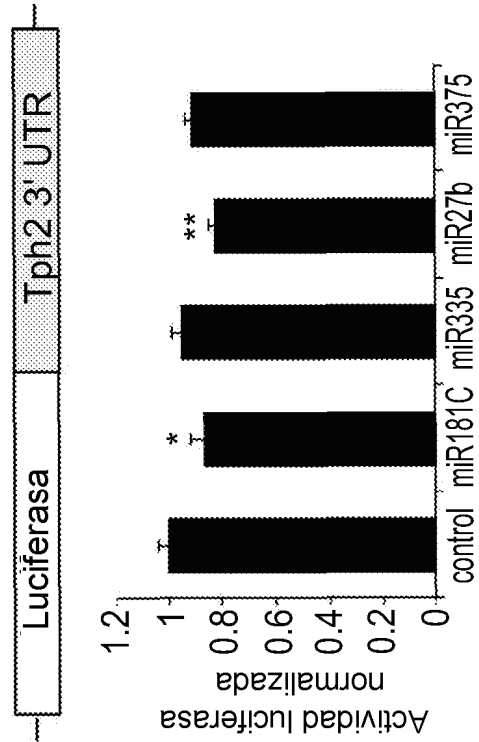


FIG. 1I

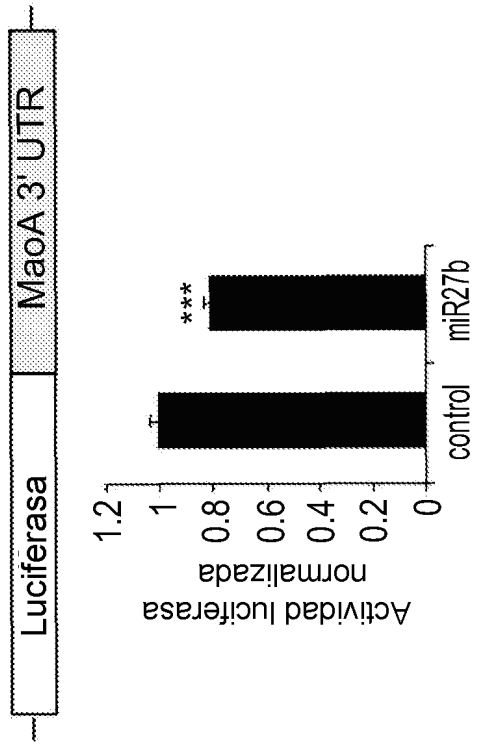


FIG. 2A

		SEQ ID NO: 24	
3'	aguguauccuuuuuuUCCGGUAu	5'	mmU-miR-135a
402	:5' acagggauugucugcuAGCCAUa	3'	Slc6a4
		SEQ ID NO: 25	
3'	aguguauccuuuuuuUCCGGUAu	5'	mmU-miR-135b
402	:5' acagggauugucugcuAGCCAUa	3'	Slc6a4
		SEQ ID NO: 26	
		SEQ ID NO: 25	

FIG. 2C

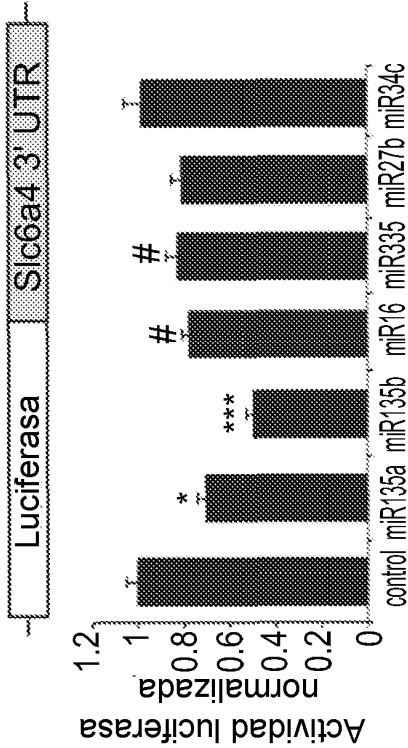


FIG. 2B

		SEQ ID NO: 24	
3'	aguguauccuUUAUUUUCGGUAu	5'	mmU-miR-135a
1865	:5' cuccugccACAUGAAGCCAUu	3'	Htr1a
		SEQ ID NO: 27	
3'	aguguauccuUACUUUUCGGUAu	5'	mmU-miR-135b
1867	:5' gccugccacAUG - AAGCCAUu	3'	Htr1a
		SEQ ID NO: 26	
		SEQ ID NO: 27	

FIG. 2D

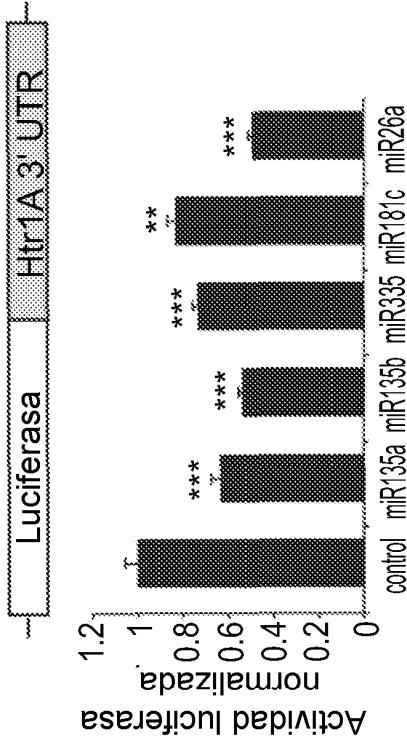


FIG. 2E

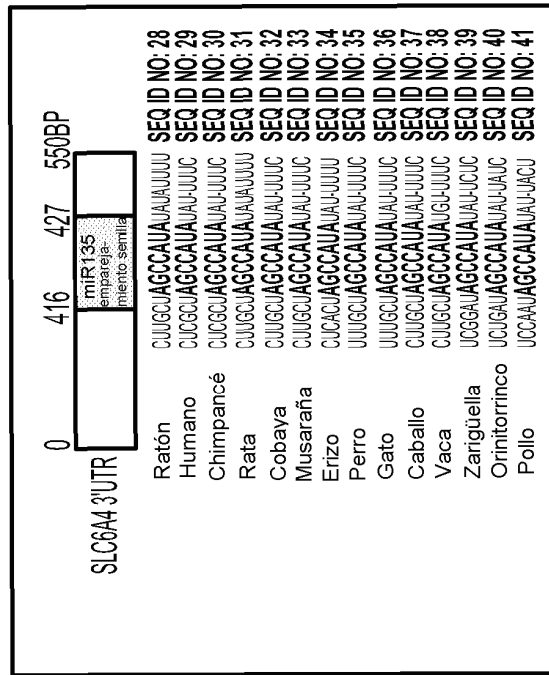


FIG. 2G

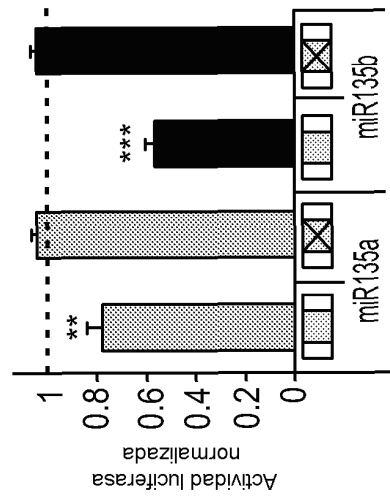


FIG. 2F

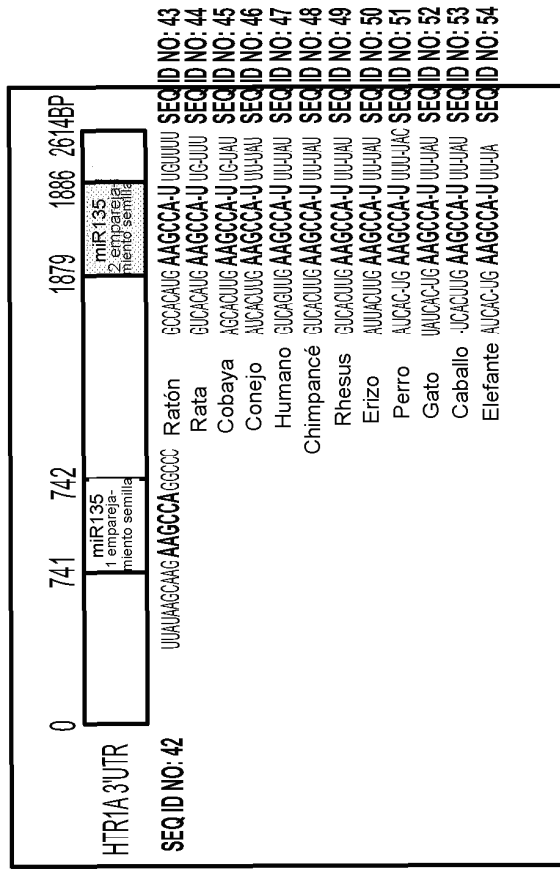
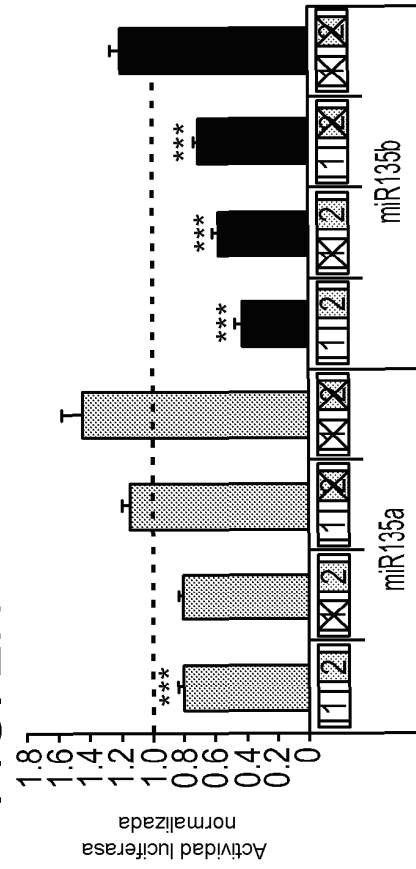
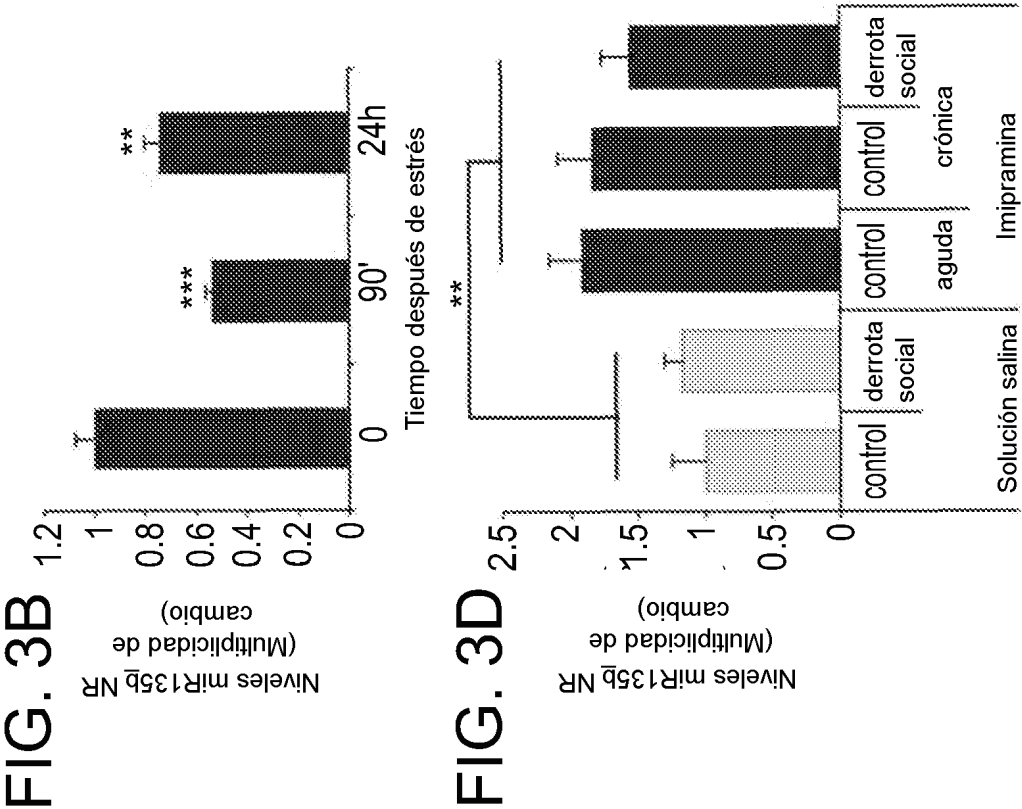


FIG. 2H





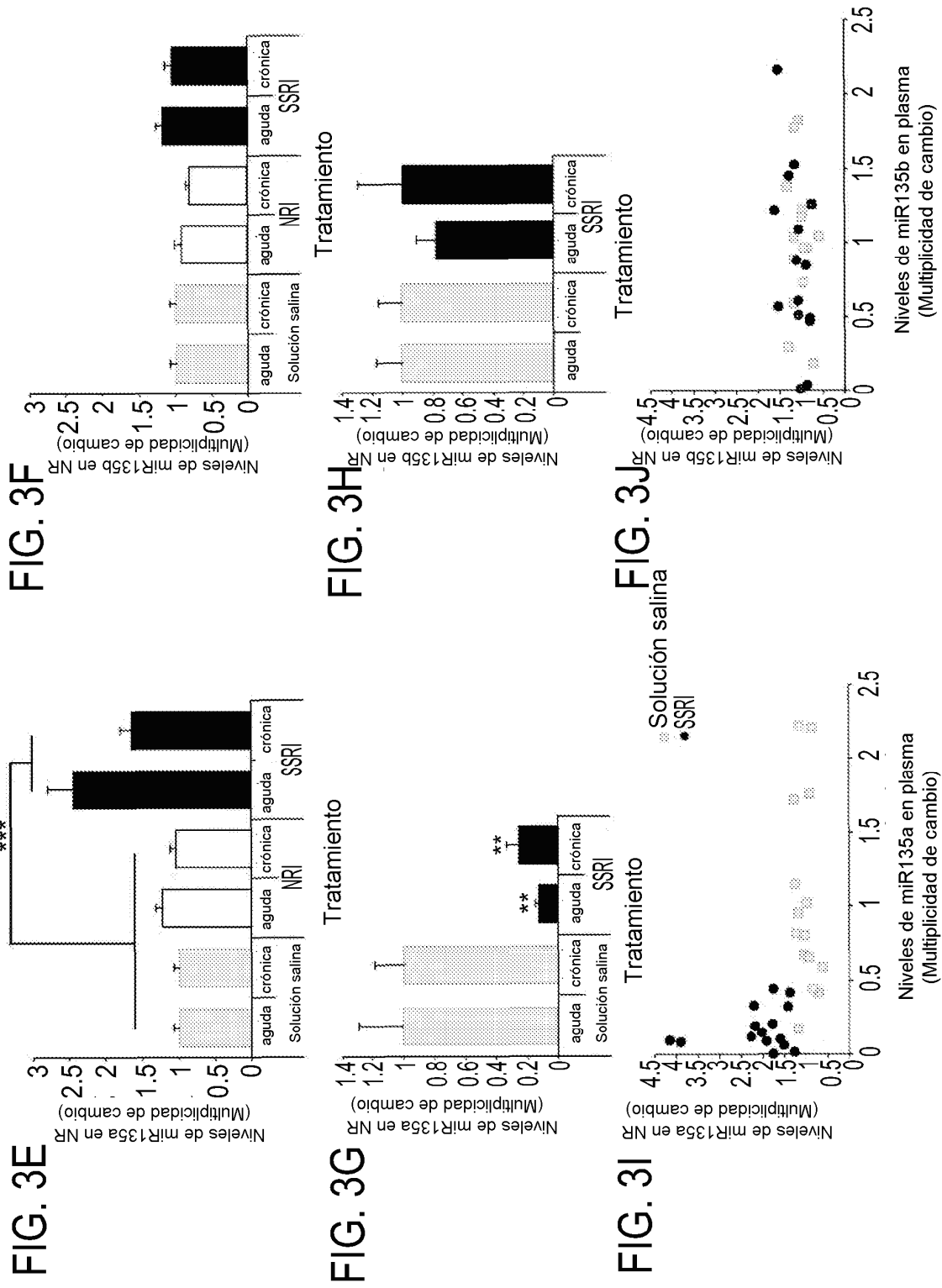


FIG. 4A

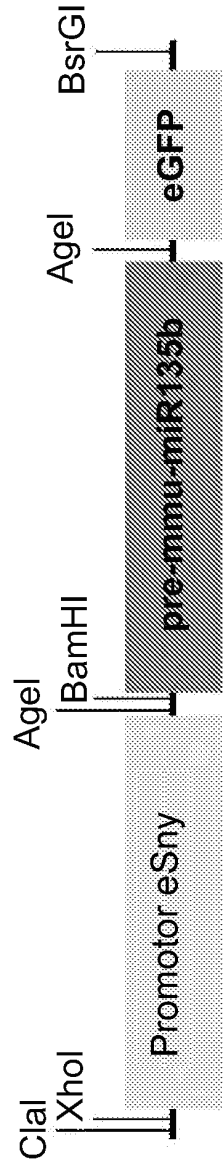


FIG. 4B

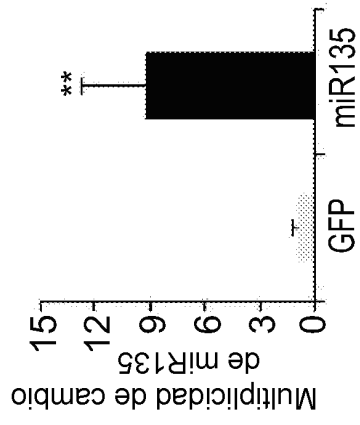


FIG. 4D

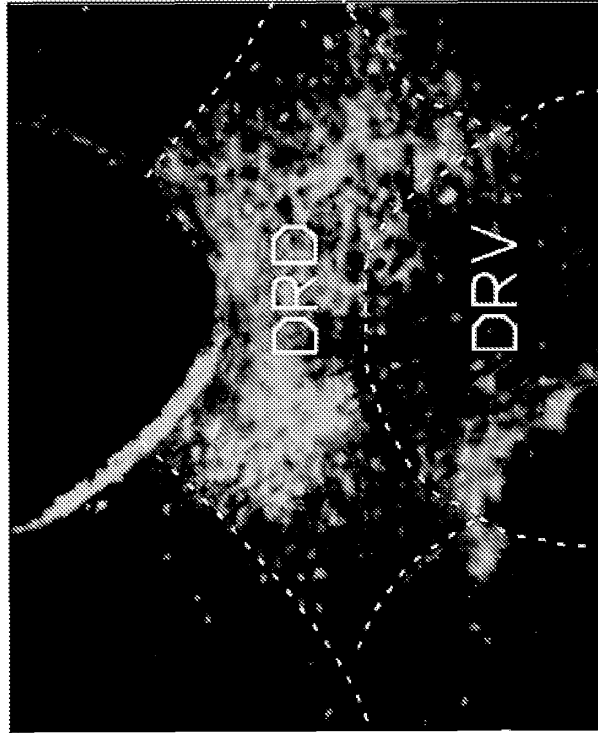


FIG. 4C

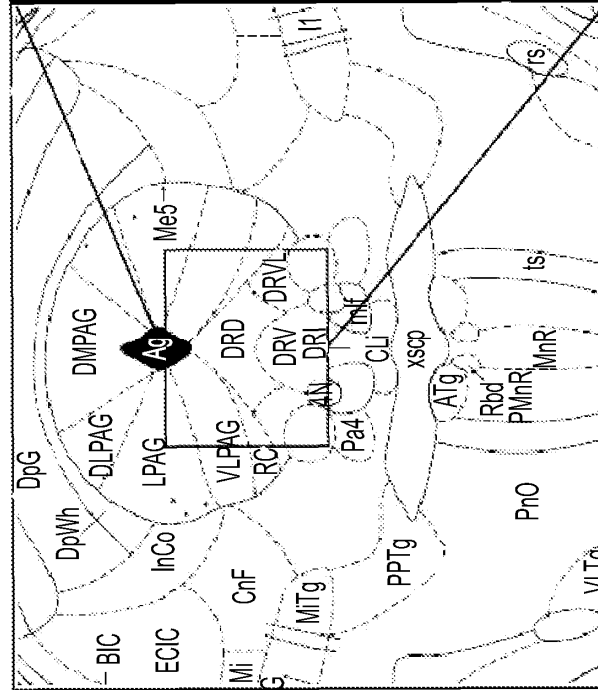


FIG. 4E

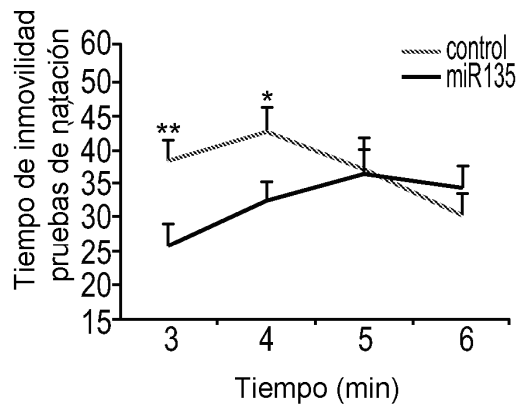


FIG. 4F

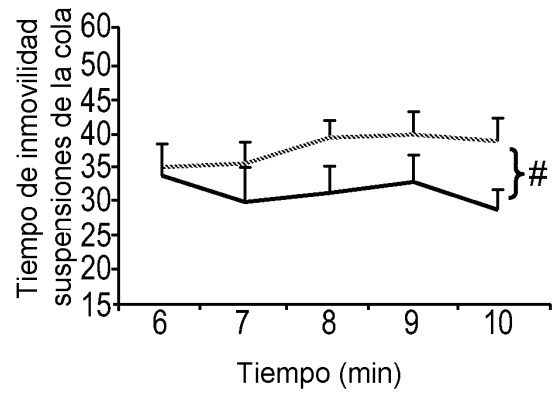


FIG. 4G

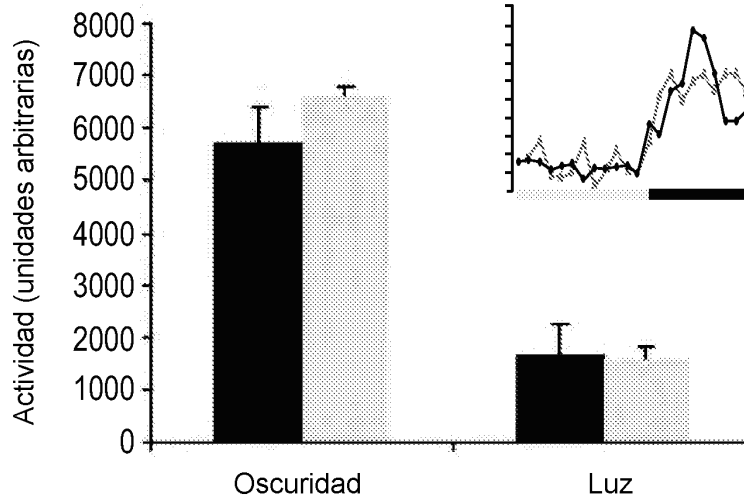


FIG. 4H

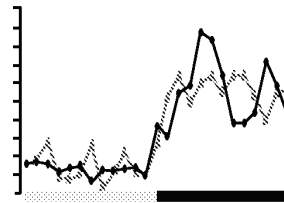


FIG. 5

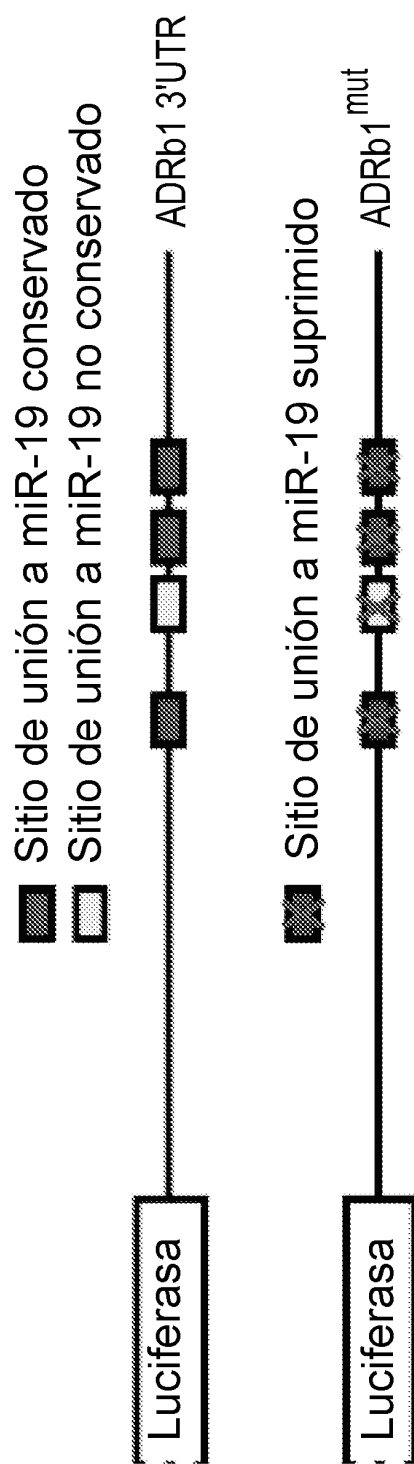


FIG. 6A

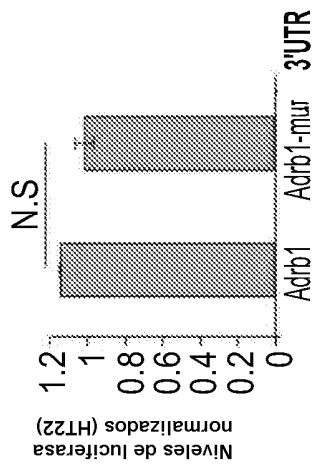


FIG. 6B

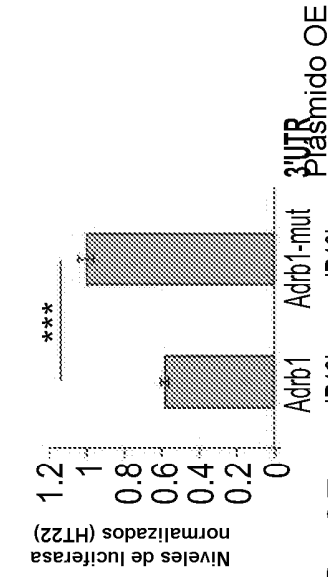


FIG. 6C

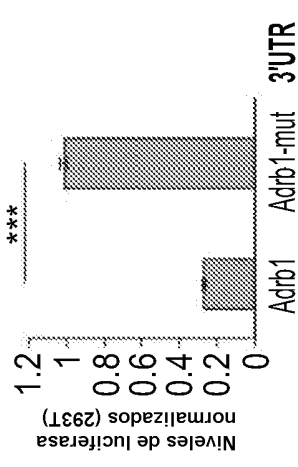


FIG. 6D

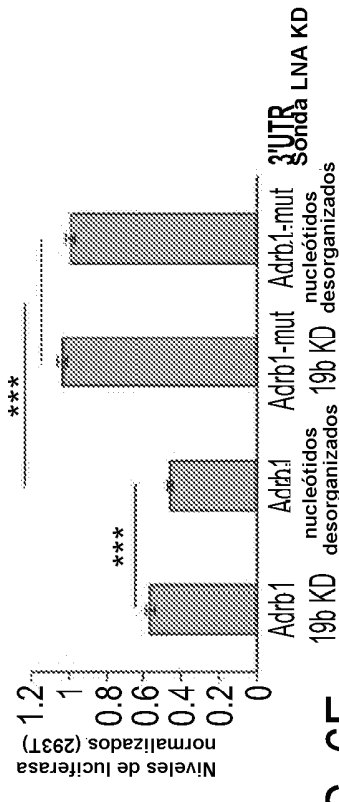


FIG. 6E

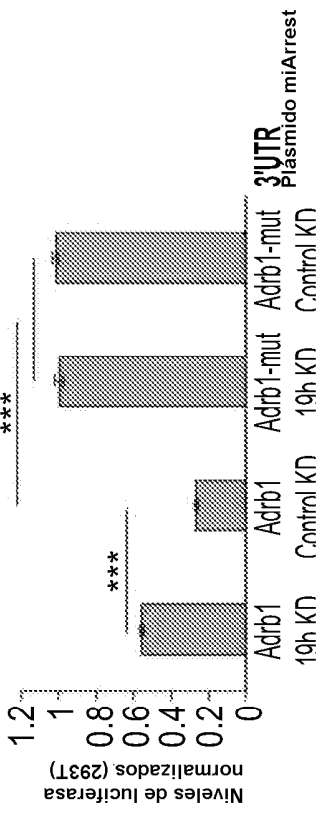


FIG. 7A

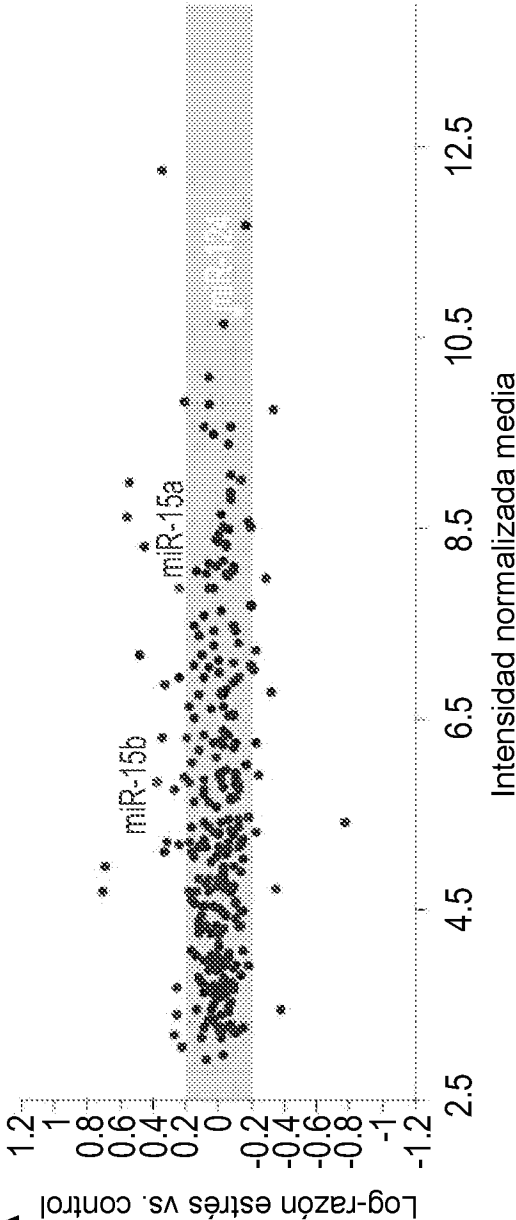


FIG. 7B

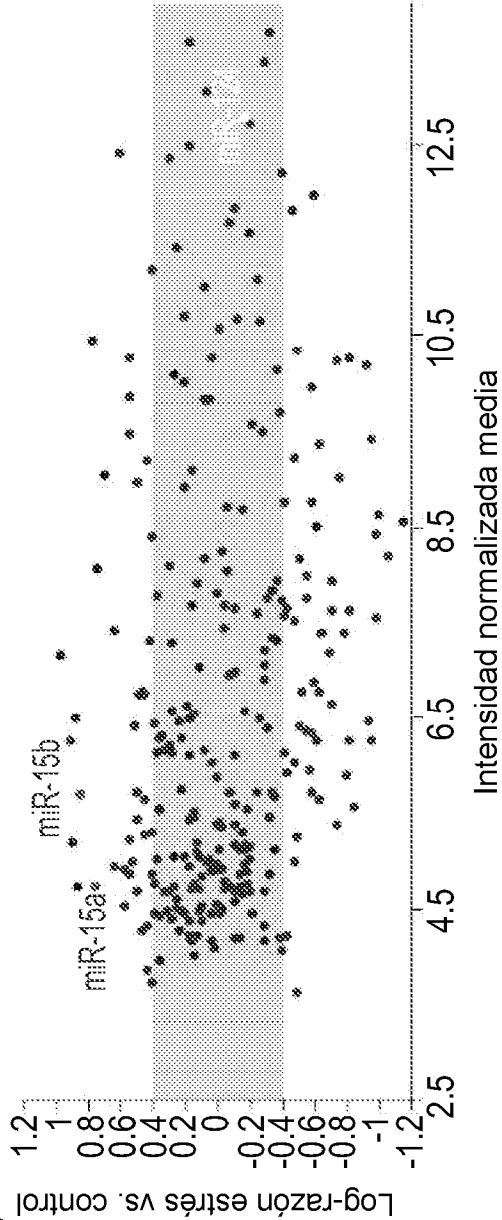


FIG. 7C

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

FIG. 7D

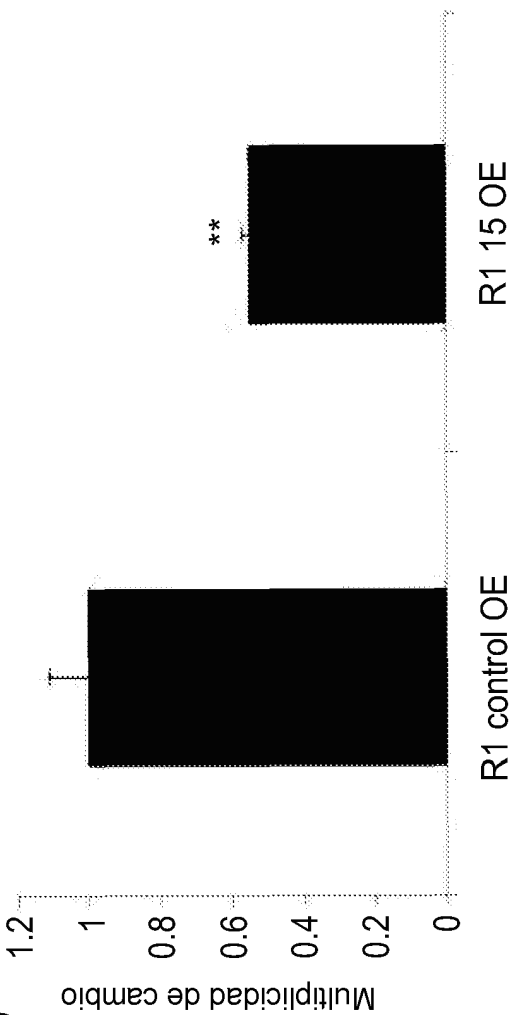


FIG. 8

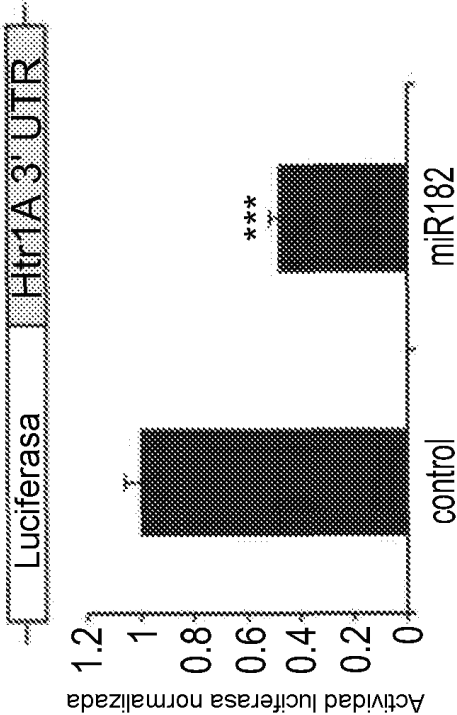


FIG. 9

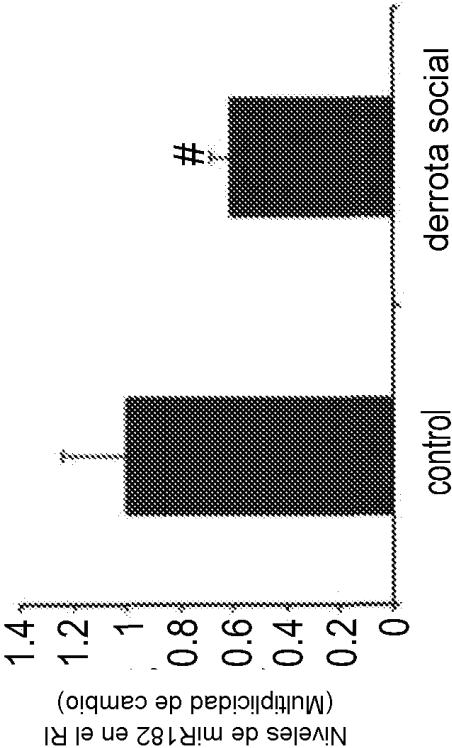
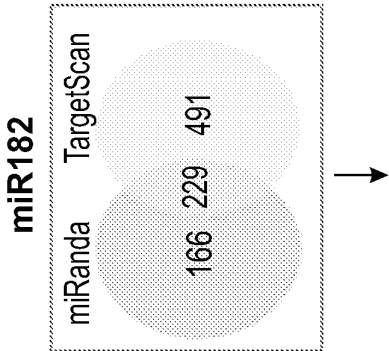


FIG. 10



SLC33A1	Familia 33 de portadores de solutos,(transportador de acetil-CoA), miembro 1
FOXP2	Caja de la cabeza del tenedor "forkhead" P2
ADCY2	Adenilato ciclasa 2 (cerebro)
ADCY6	Adrenérgico, alfa-2C, receptor
BDNF	Factor neurotrófico derivado de cerebro
GRIA1	Receptor de glutamato, ionotrópico, AMPA1
GRIA3	Receptor de glutamato, ionotrópico, AMPA3
GRIK3	Receptor de glutamato, ionotrópico, kainato 3
GRM5	Receptor de glutamato, metabotrópico 5
NUFIP2	Proteína 2 que interactúa con la proteína de retraso mental del X fragil nuclear
CACNB4	Canal de calcio, dependiente del voltaje, subunidad beta 4
SLC1A1	Familia 1 de portadores de solutos (transportador de glutamato de alta afinidad neuronal/epitelial,sistema Xag, miembro 1)
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales
KCNH5	Canal de potasio regulado por voltaje, subfamilia H (relacionada con eag), miembro 5
CREB1	Proteína 1 de unión al elemento de respuesta a AMPc
FXR1H	Gen 1 de retraso mental de X frágil, homólogo autosómico
GAD2	Descarboxilasa 2 de ácido glutámico
FMR1	Homólogo 1 del síndrome de retraso mental de X frágil
HTR2C	Receptor 2C de 5-hidroxitriptamina (serotonina)
HDAC9	Histona desacetilasa 9

FIG. 11A

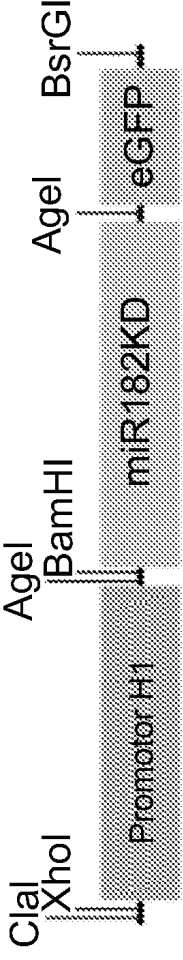
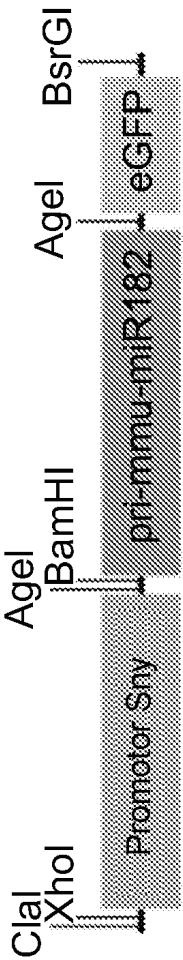


FIG. 11C

FIG. 11B

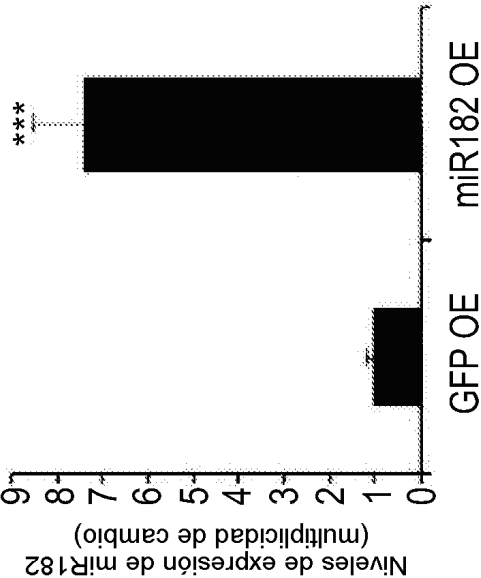


FIG. 12A

Niveles de miR-19a en la PFC después de la administración aguda de NRI

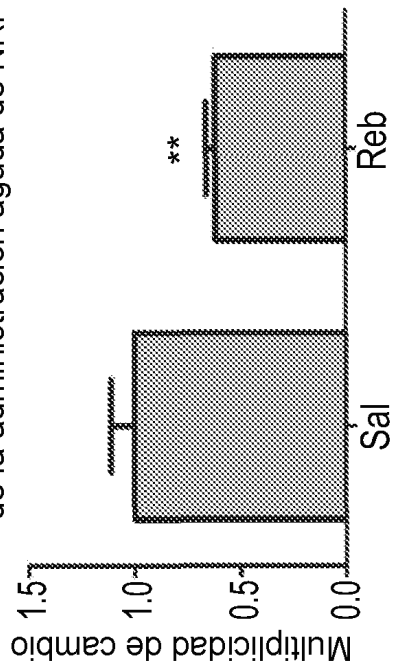


FIG. 12B

Niveles de miR-19b en la PFC después de la administración aguda de NRI

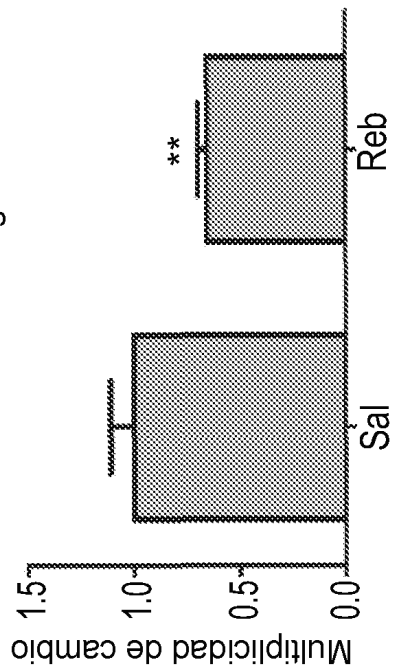


FIG. 12C

Niveles de miR-19a en la PFC después de la administración crónica de NRI

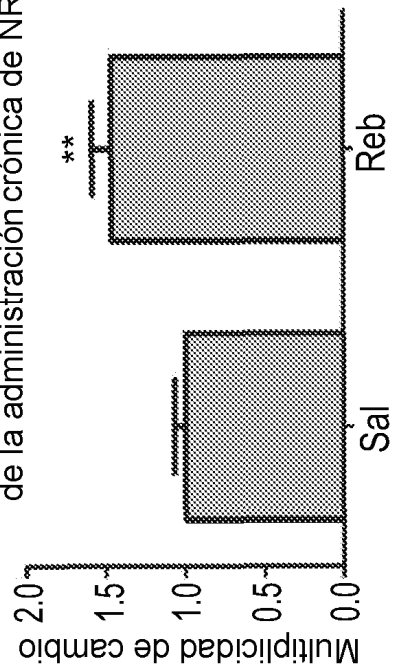


FIG. 12D

Niveles de miR-19b en la PFC después de la administración crónica de NRI

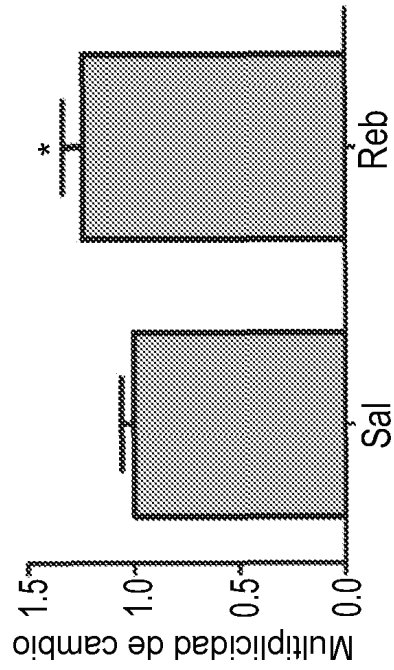


FIG. 13A

Niveles de miR-19a en la PFC
después de la derrota social

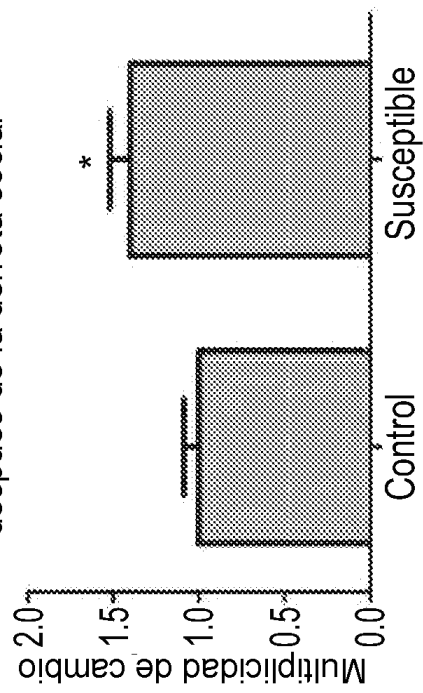


FIG. 13C

Niveles de miR-19a en la amígdala
después de la derrota social

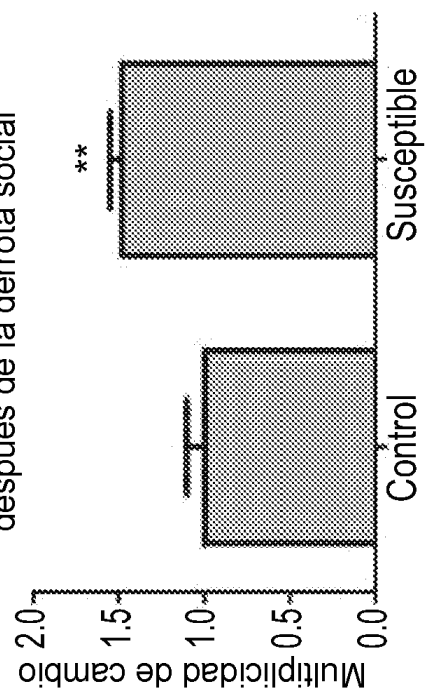


FIG. 13B

Niveles de miR-19b en la PFC
después de la derrota social

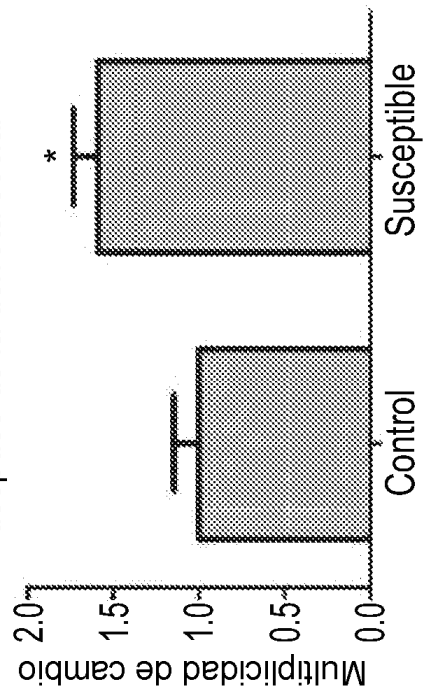


FIG. 13D

Niveles de miR-19b en la amígdala
después de la derrota social

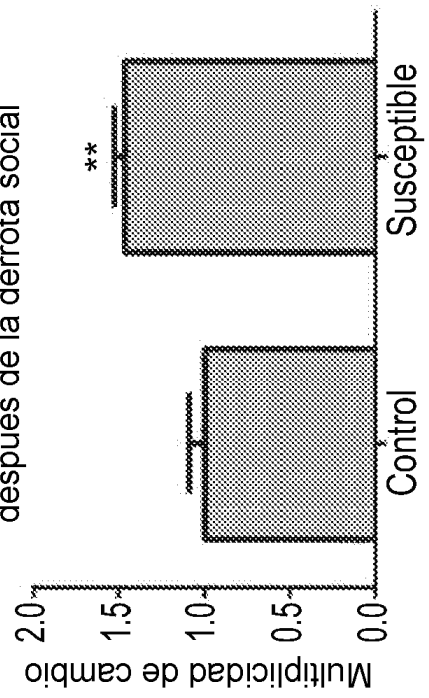


FIG. 14

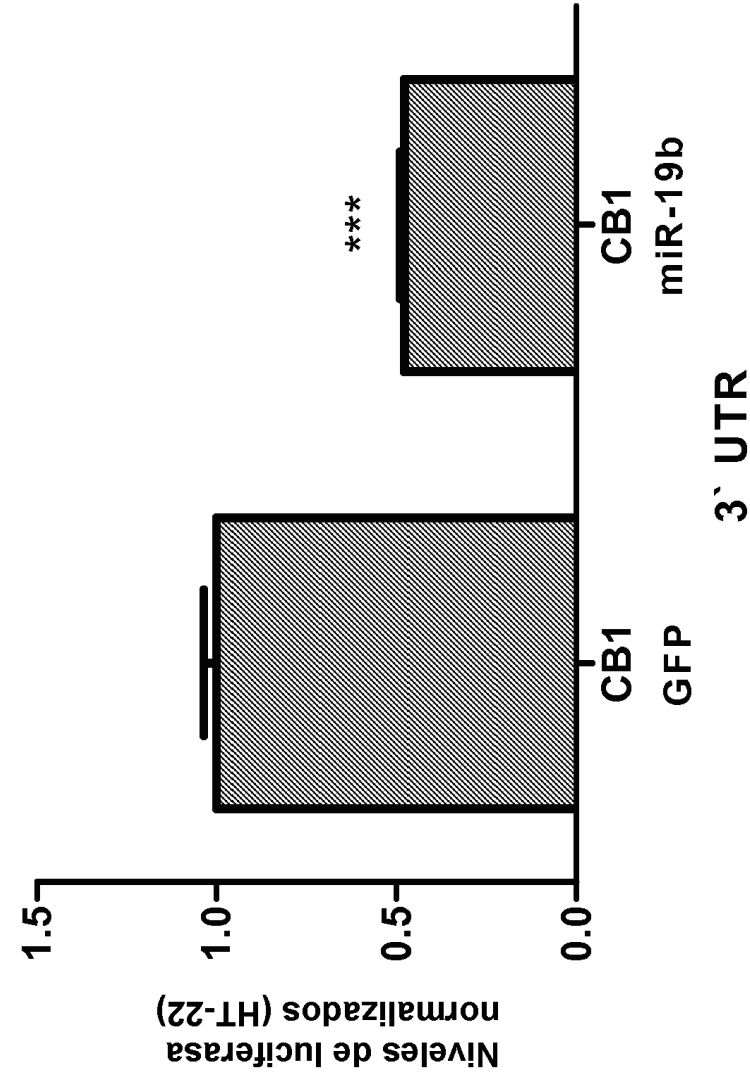


FIG. 15A

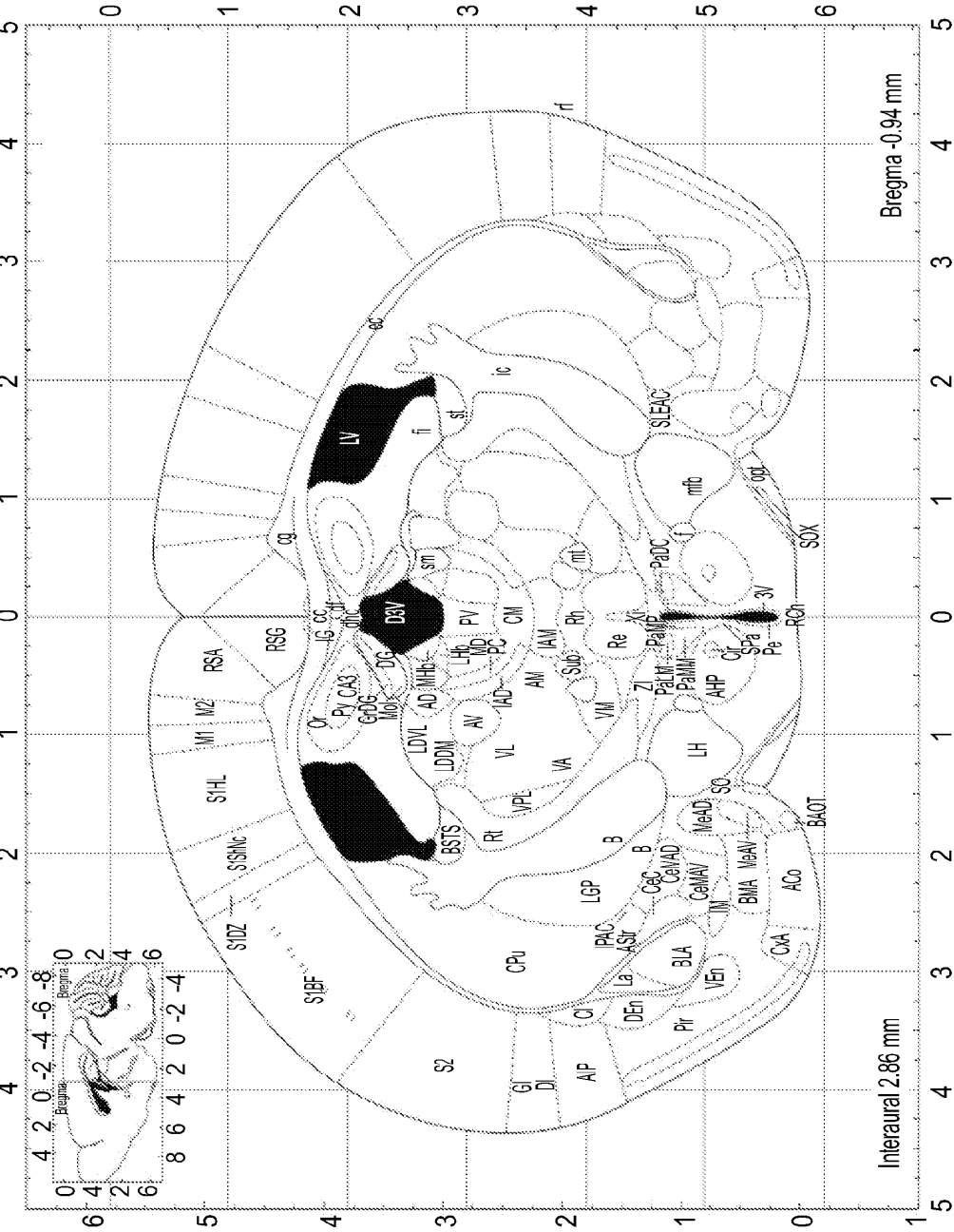


FIG. 15B

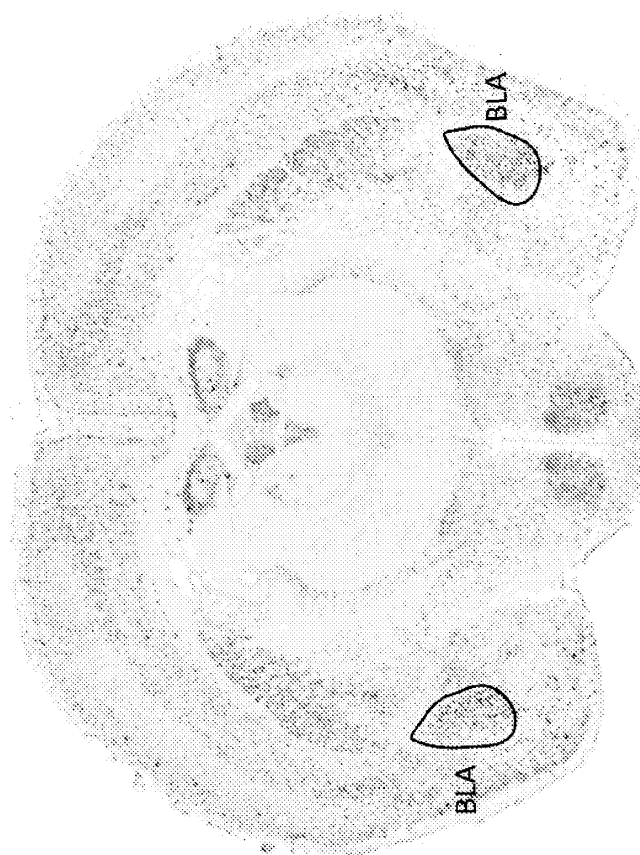
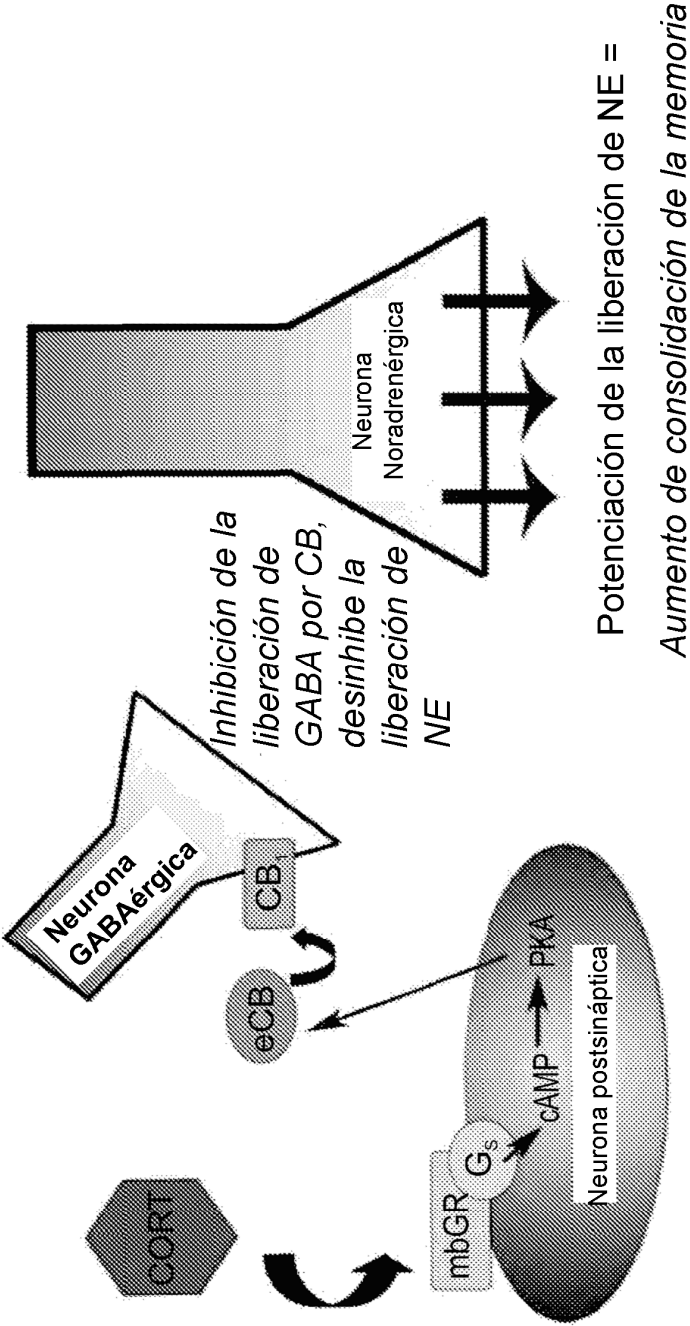
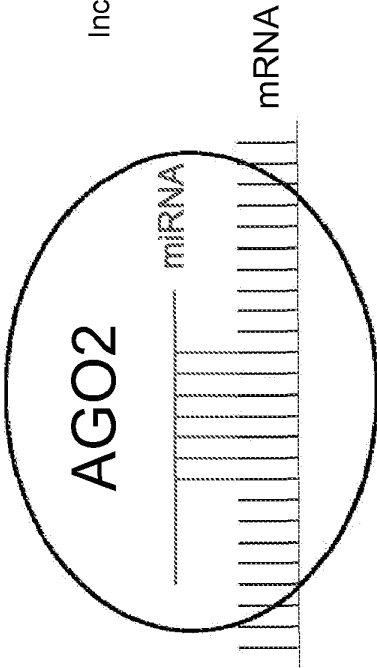


FIG. 16



Incorporada de Hill M.N. and McEwen B.S. Proc of the Nat Acad of Sci of the USA (2009) 106:4579-4580

FIG. 17A



Incorporada de Meister G. et al., Molecular cell (2004) 15:185-197

FIG. 17B

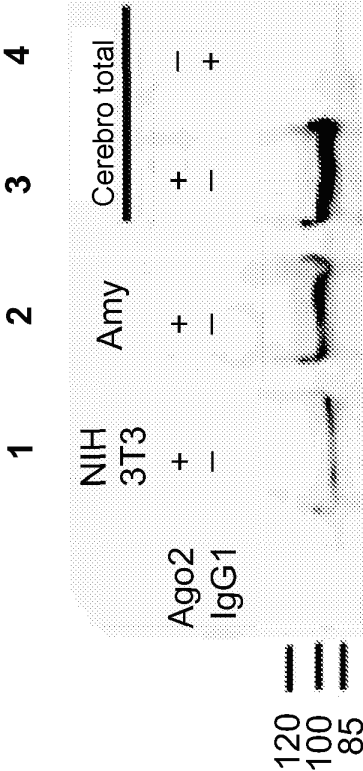
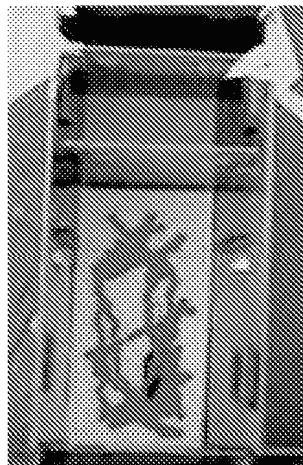


FIG. 18A

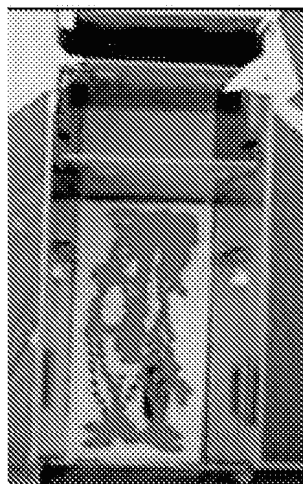
Susceptible



Habituación

FIG. 18B

Resiliente



Ratón
desconocido

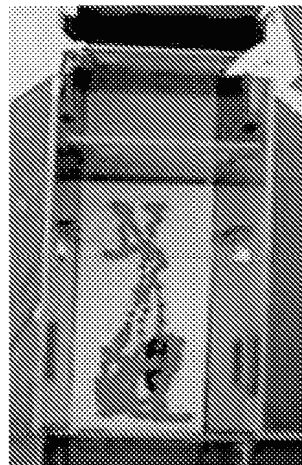


FIG. 18D

FIG. 18D

FIG. 20A
mmu-mir-15a , Ratón-miR

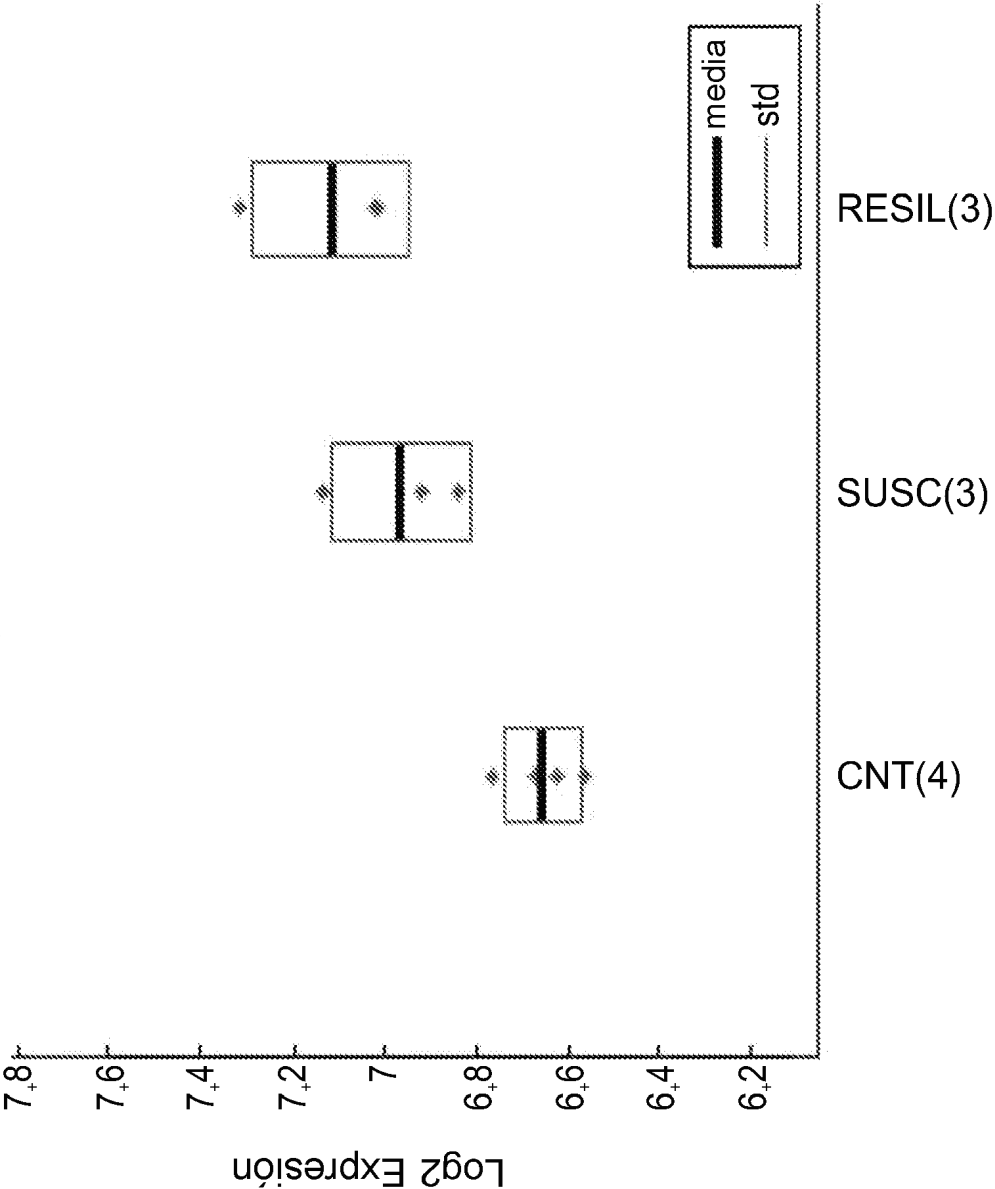


FIG. 20B

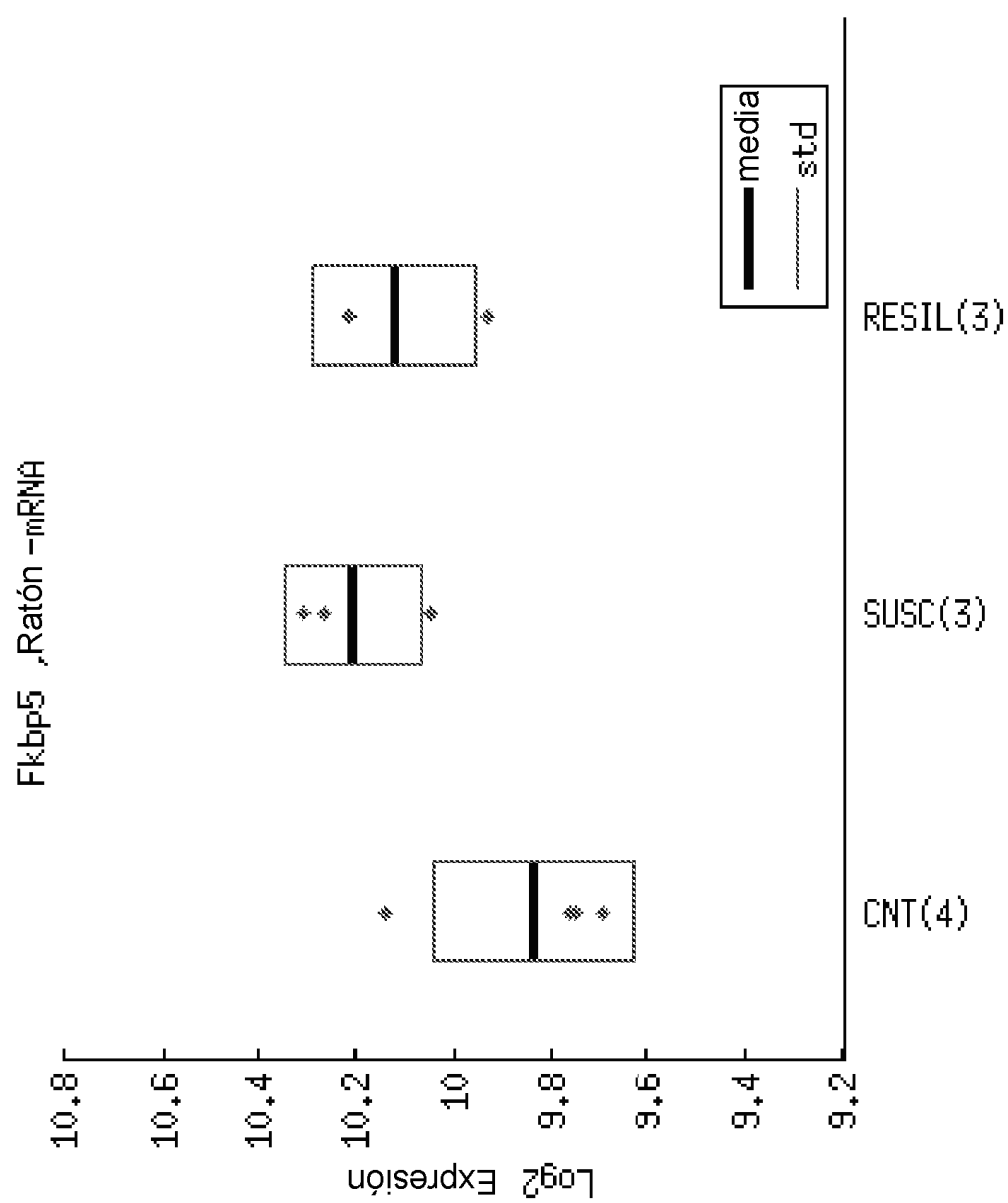


FIG. 20C

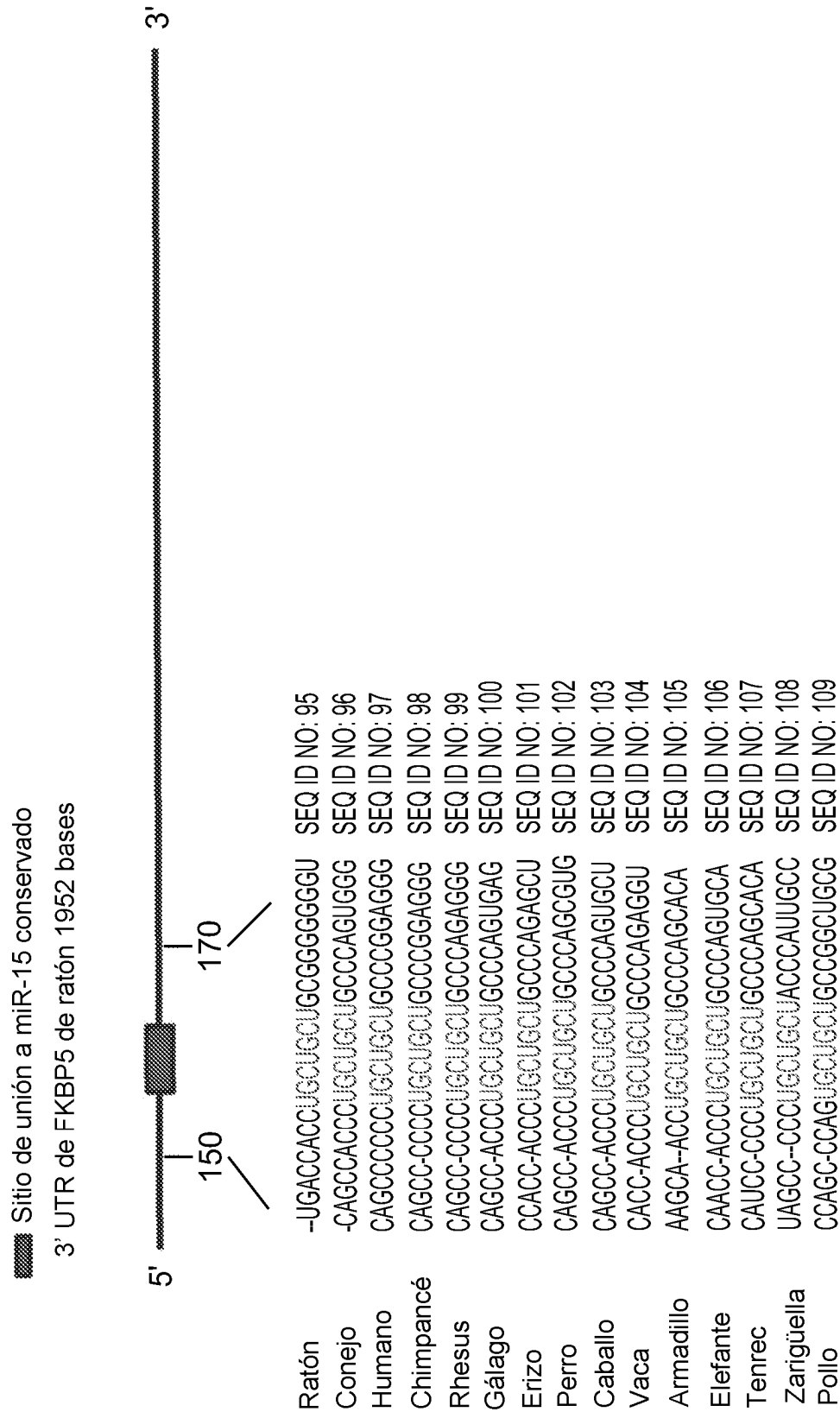


FIG. 21B

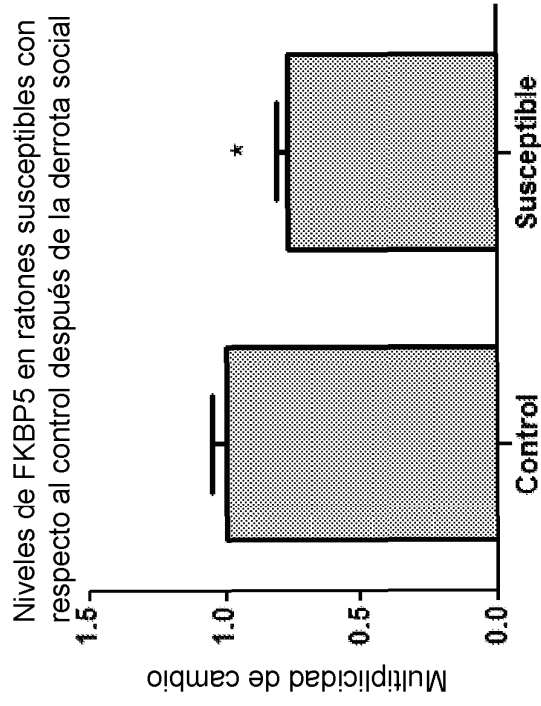


FIG. 21A

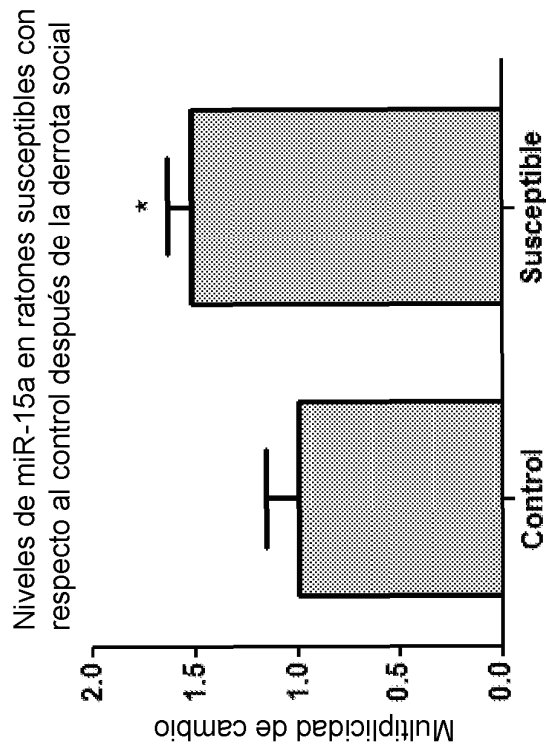


FIG. 22

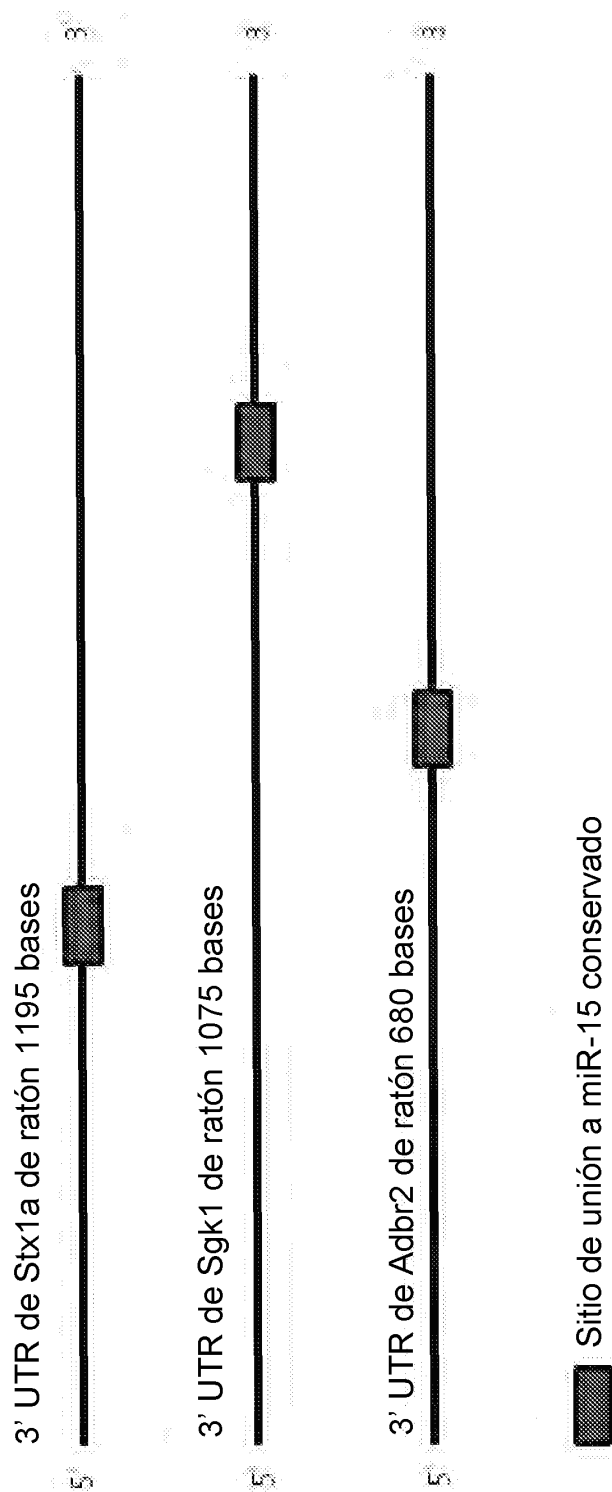


FIG. 23

Niveles de miR-181b después de la derrota social

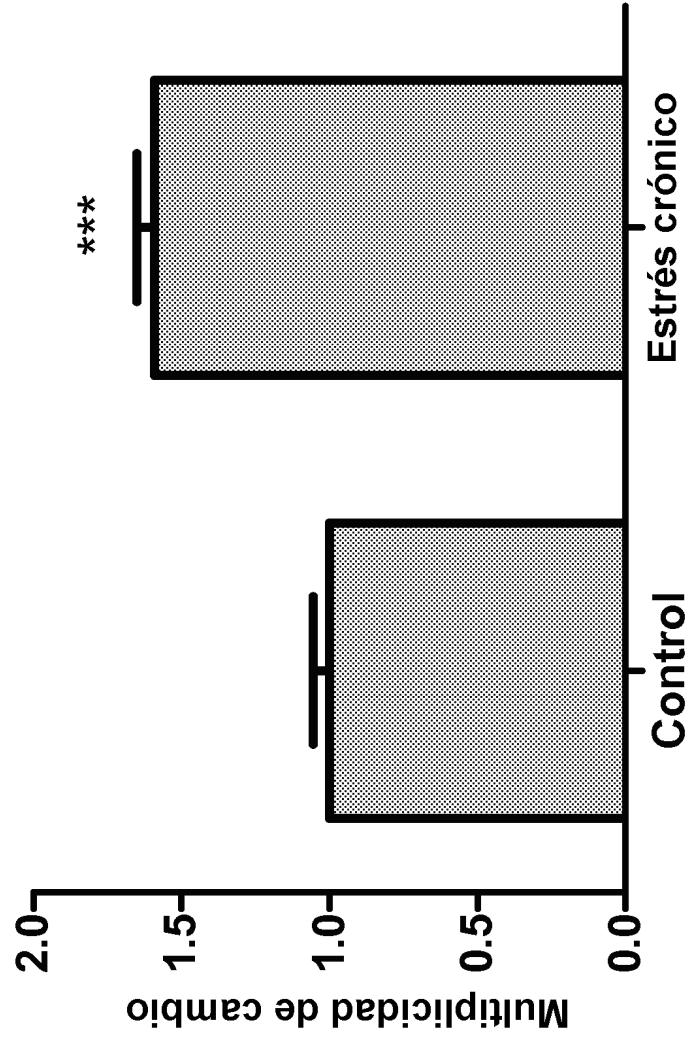


FIG. 24

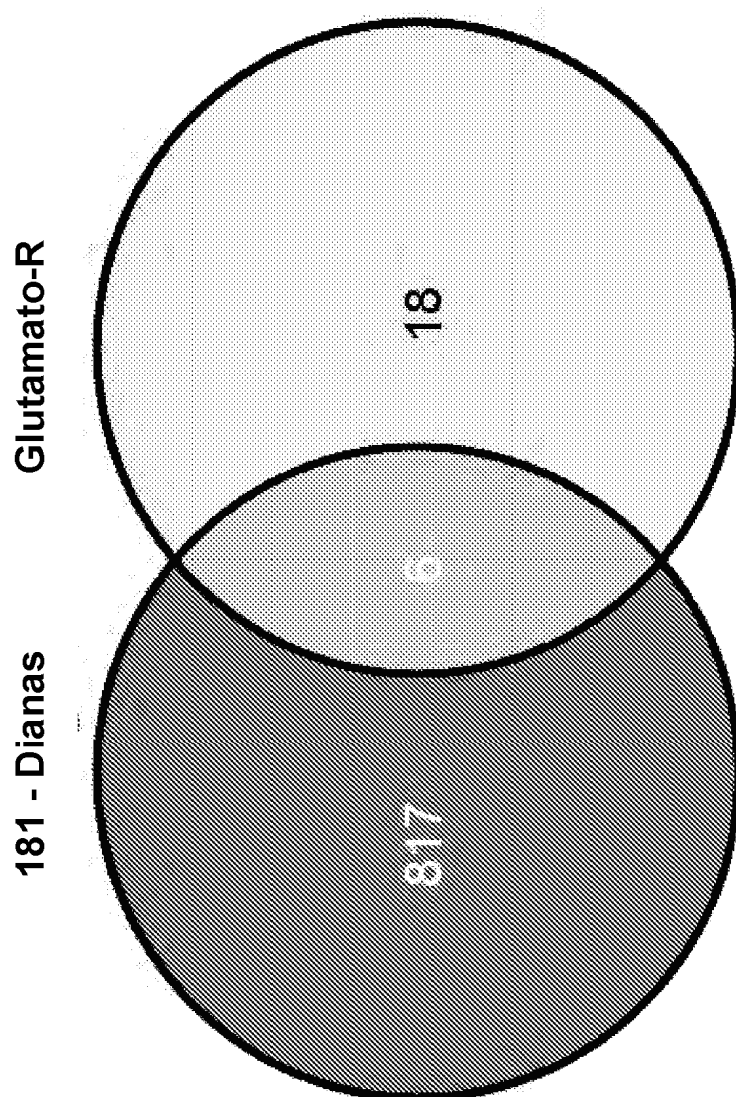


FIG. 25

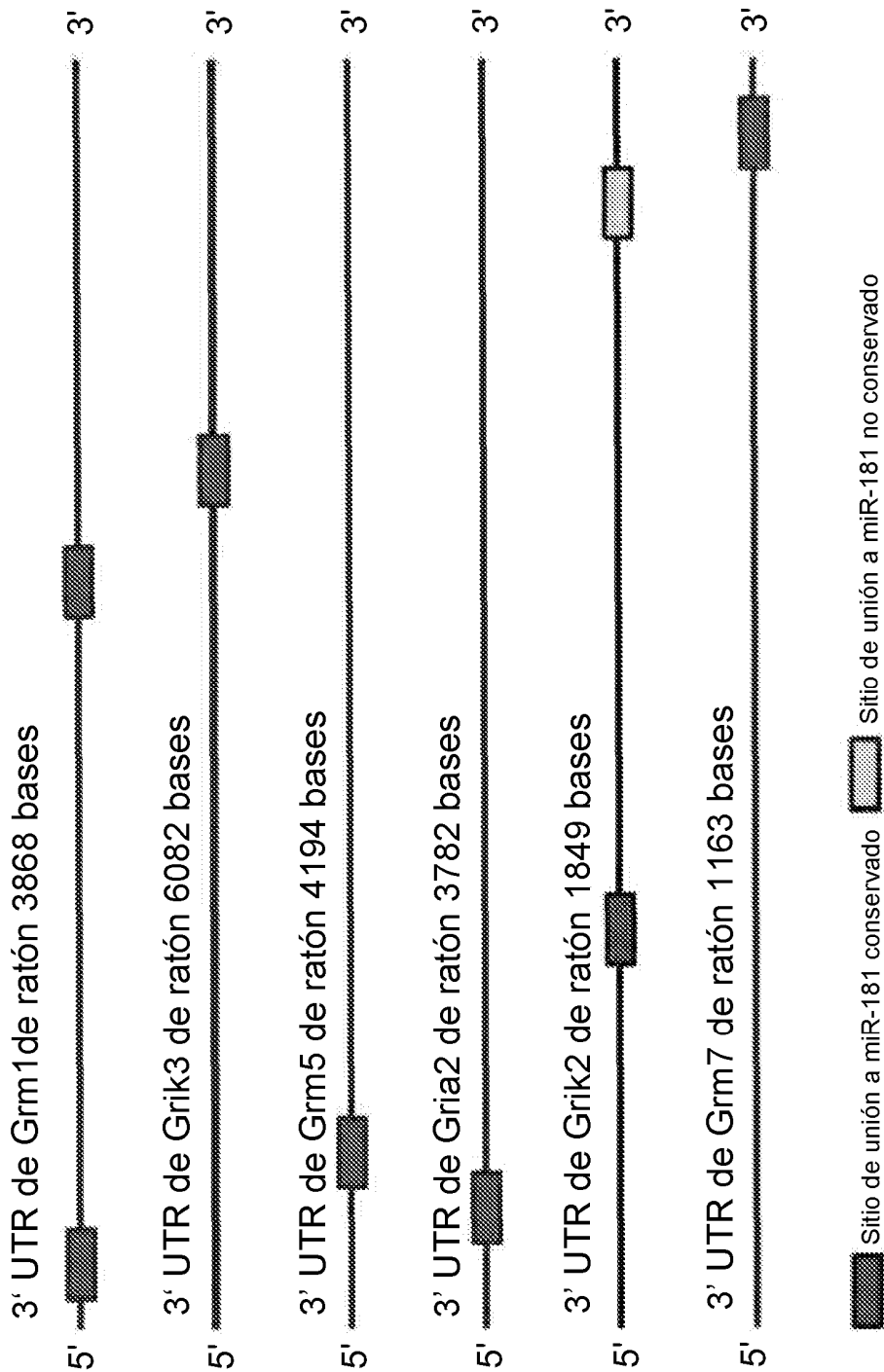


FIG. 26

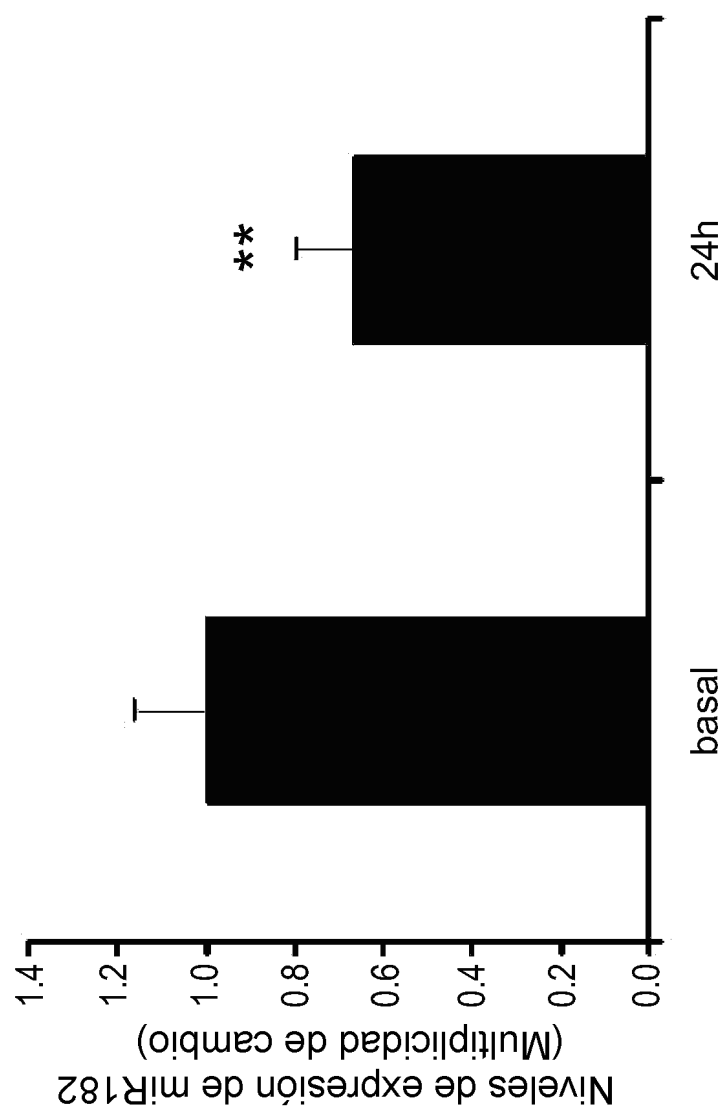


FIG. 27A

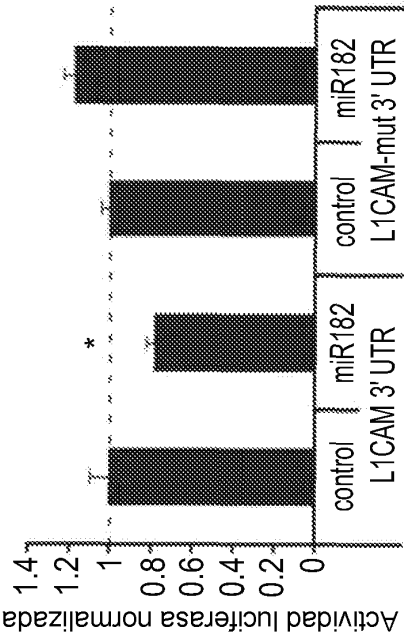
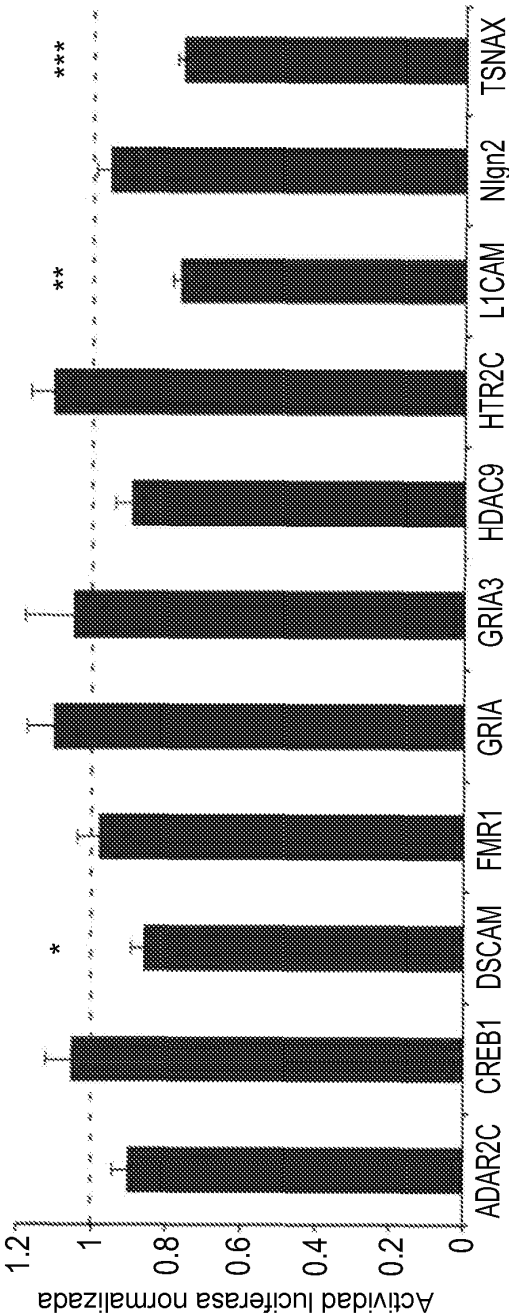


FIG. 27B

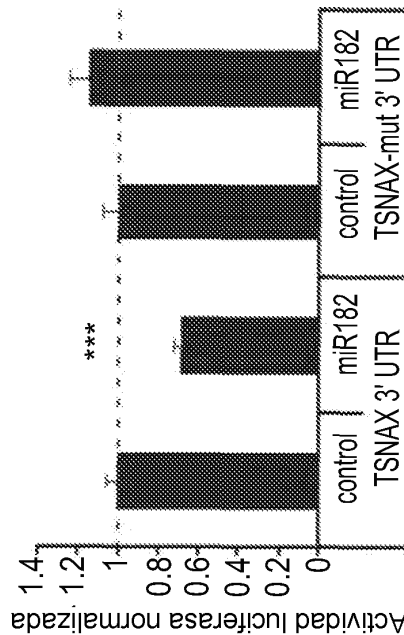


FIG. 27C

FIG. 28A
miR135a

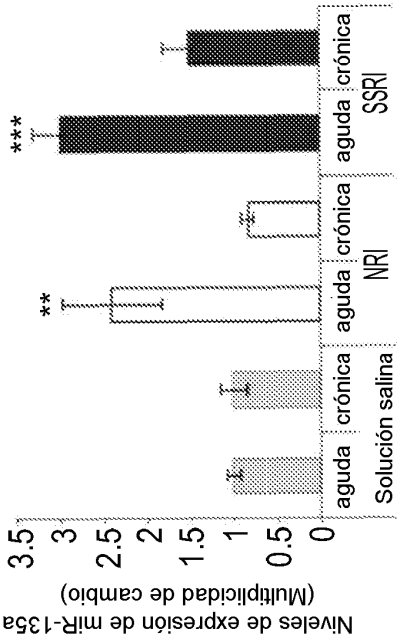


FIG. 28B
miR135b

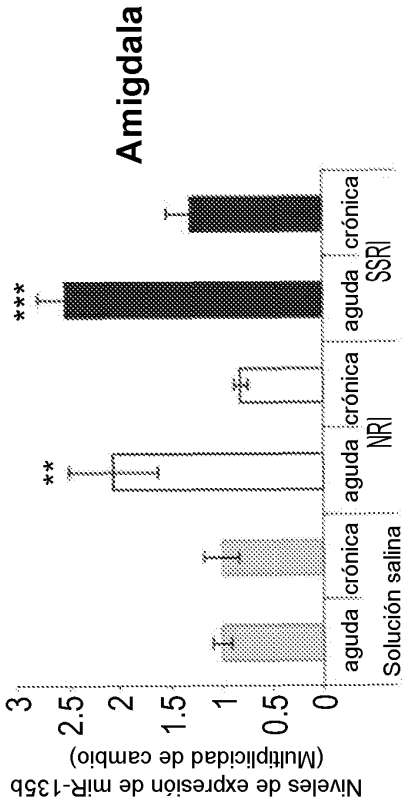


FIG. 28C

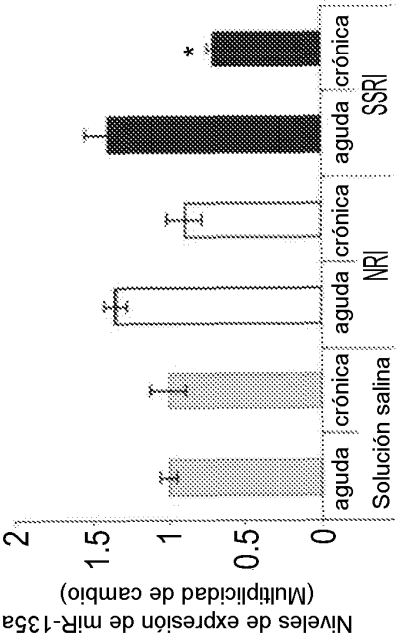


FIG. 28D

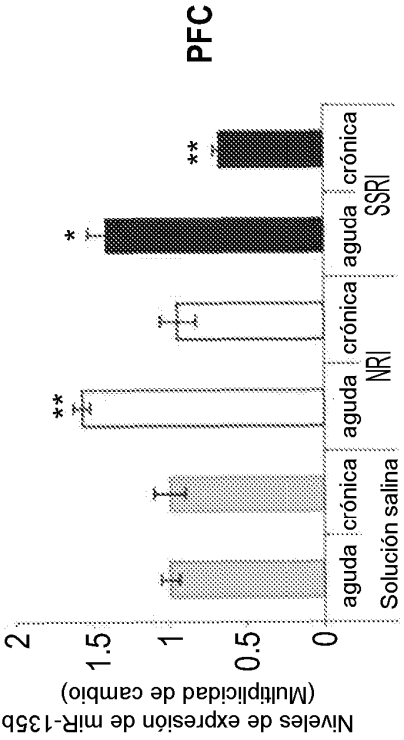


FIG. 29B

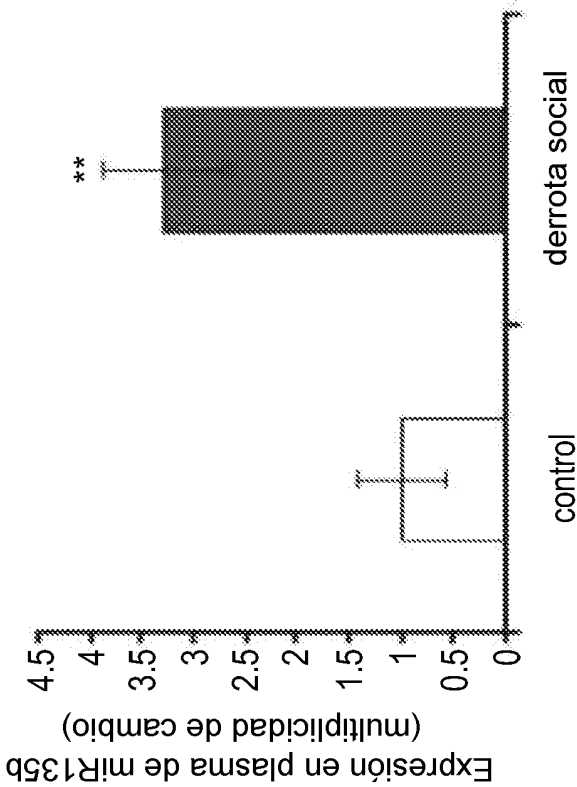


FIG. 29A

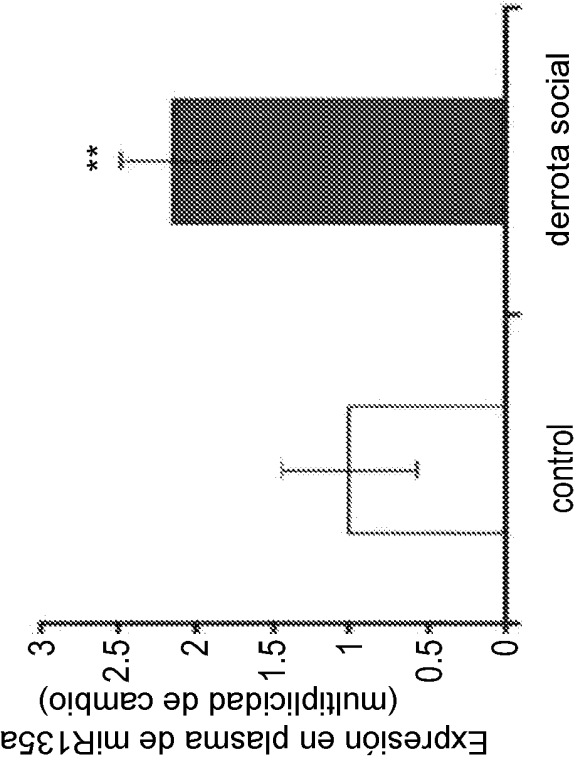


FIG. 30B

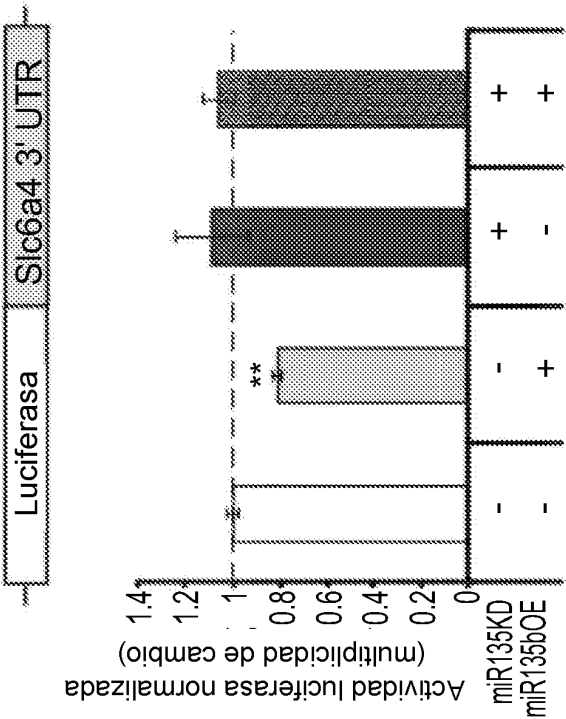


FIG. 30A

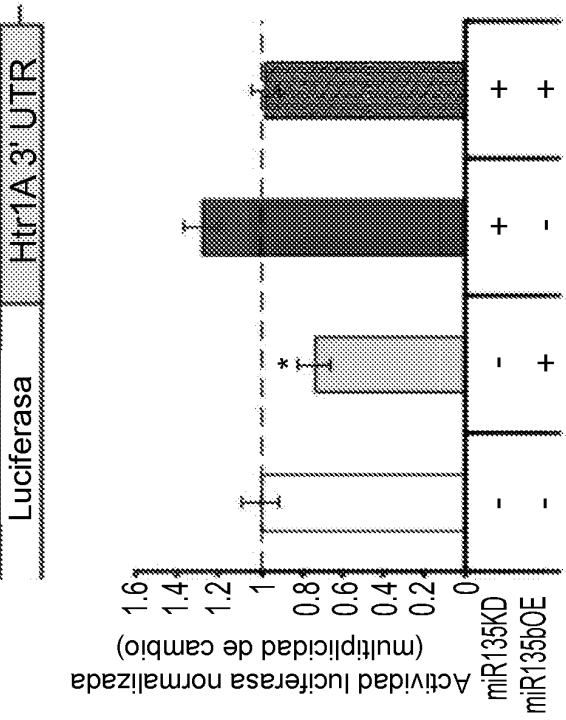


FIG. 30C

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

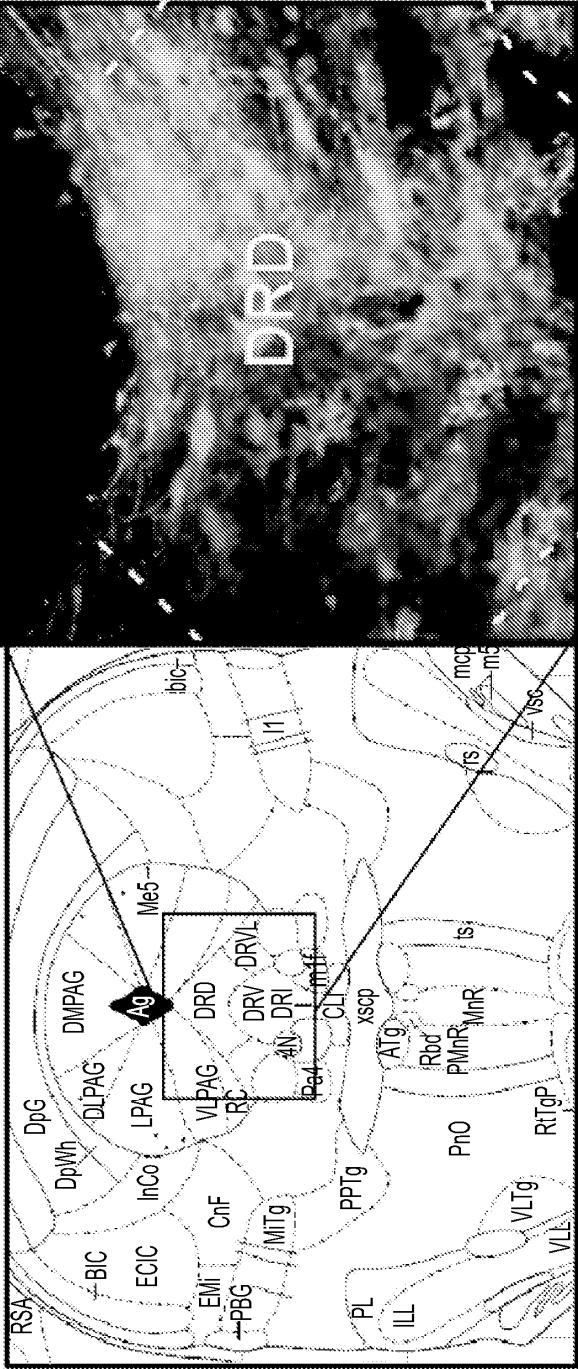


FIG. 30D

FIG. 30E

FIG. 31B

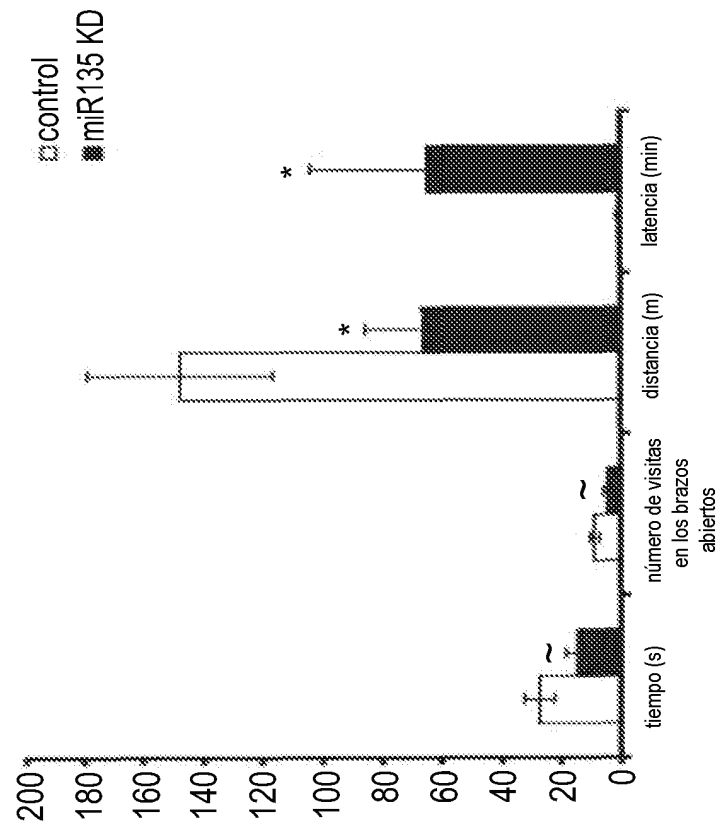


FIG. 31A

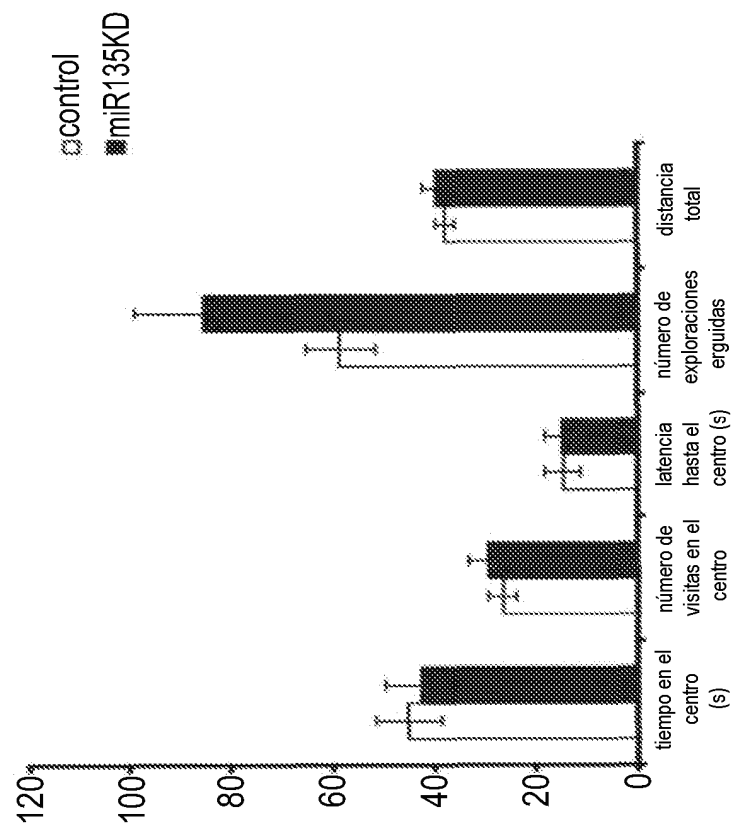


FIG. 31C

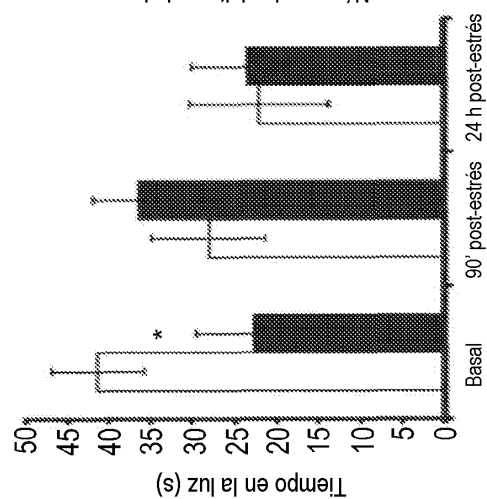


FIG. 31D

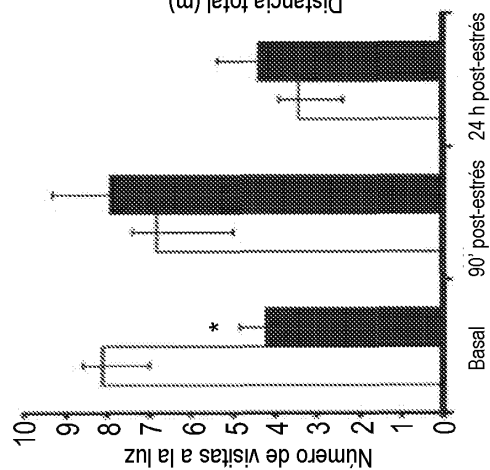


FIG. 31E

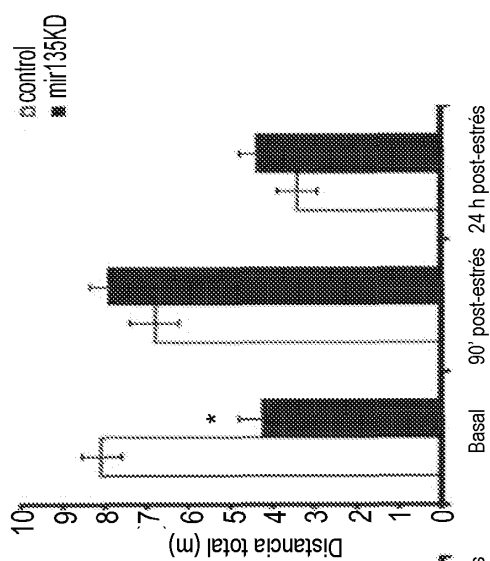


FIG. 31G

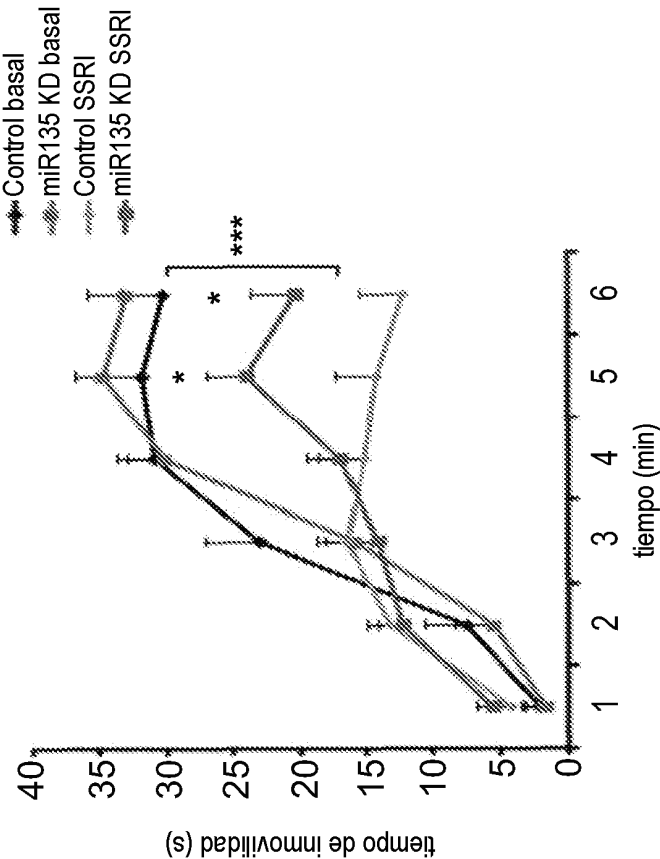


FIG. 31F

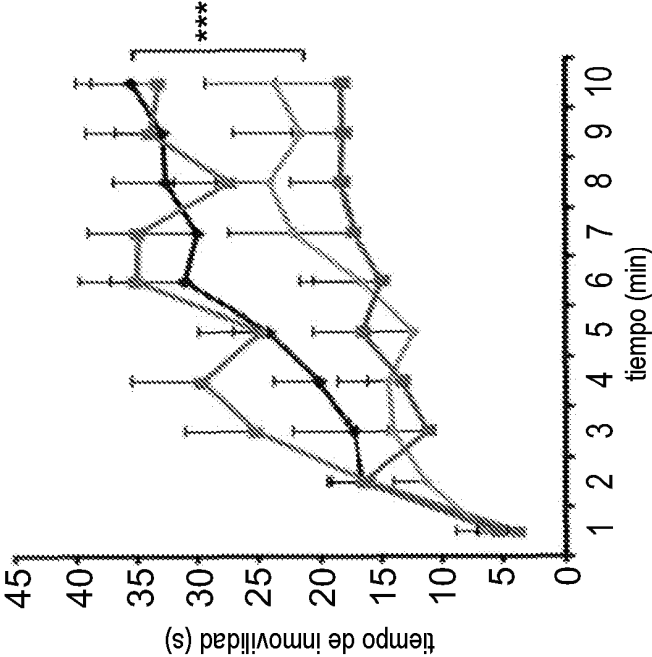


FIG. 32

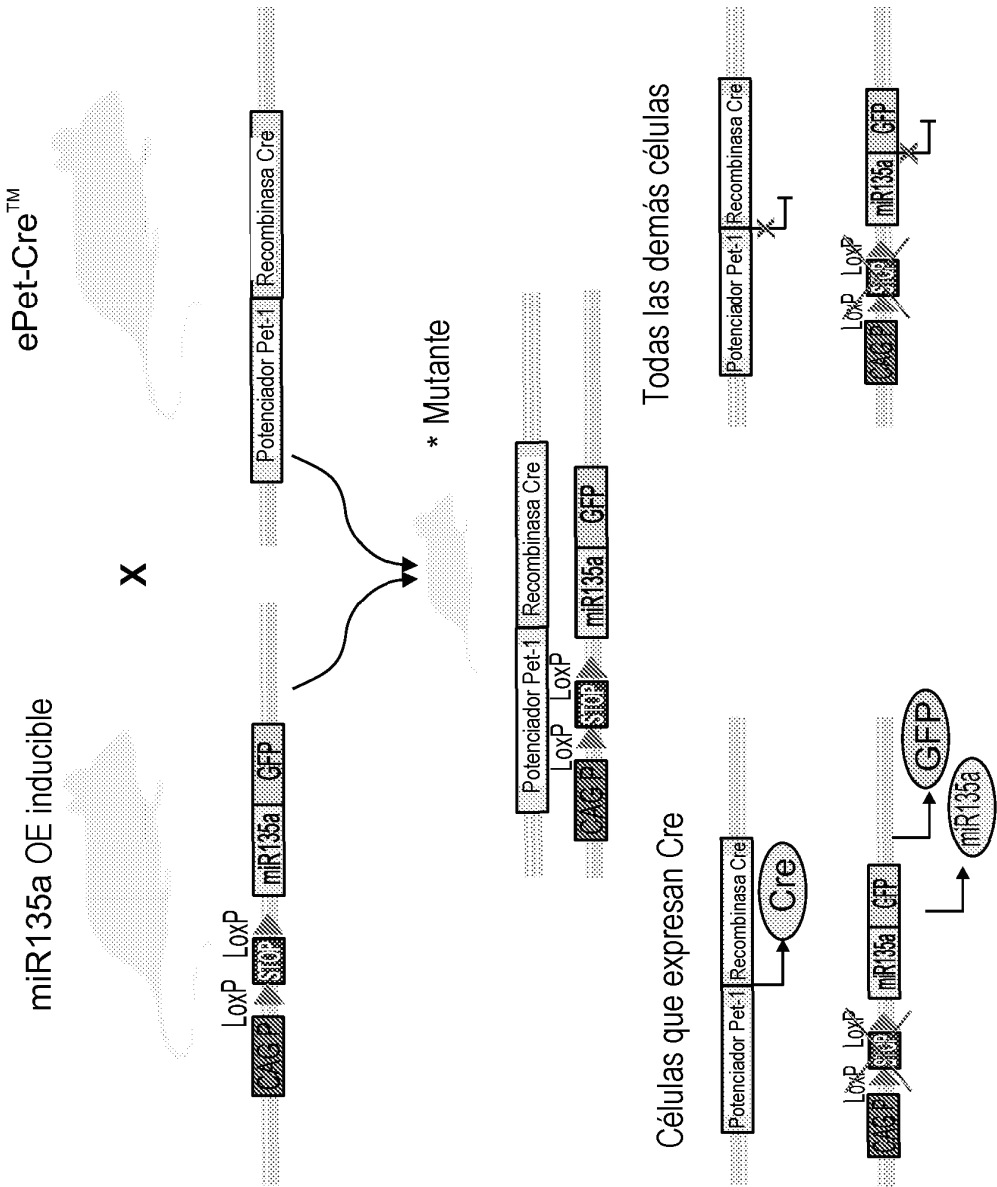


FIG. 33A

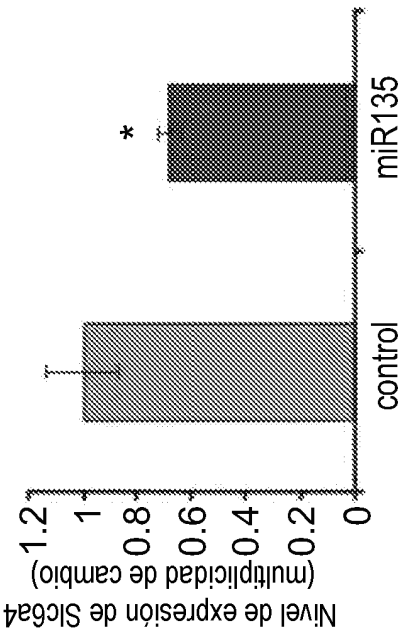
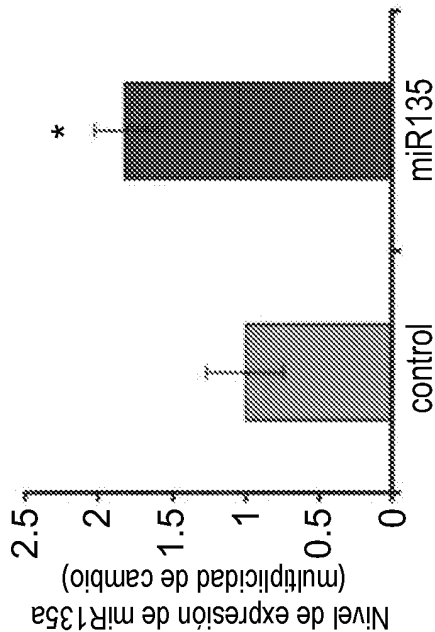


FIG. 33B

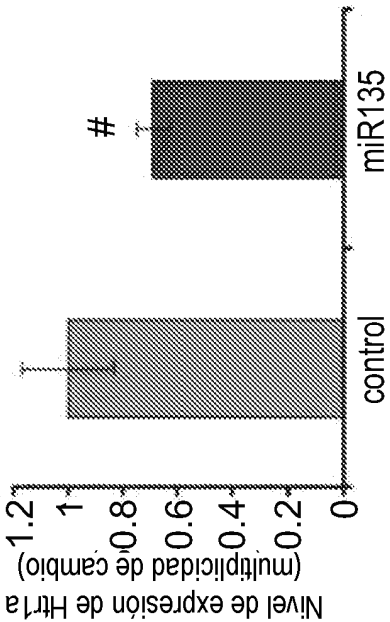


FIG. 33C

FIG. 34A

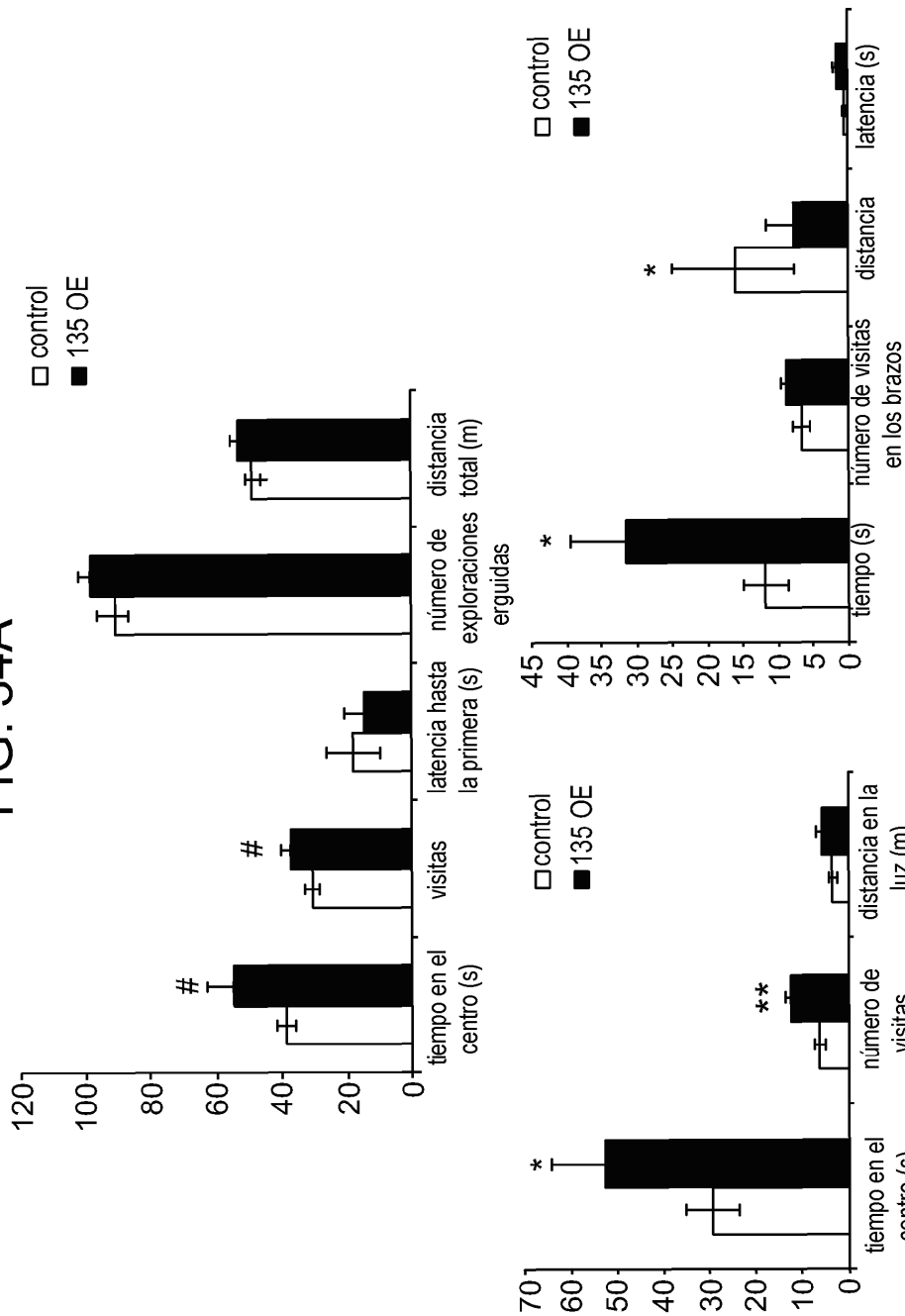


FIG. 34B

FIG. 34C

