

Universidad
de Oviedo



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

Máster en Biomedicina y Oncología Molecular

“Relevancia funcional *in vivo* de la familia miR-29 en el desarrollo de la fibrosis pulmonar”

Trabajo Fin de Máster

Xurde Menéndez Caravia

3 de junio de 2014

AGRADECIMIENTOS

Quisiera que estas líneas, lejos de formalismos, sirviesen realmente para reconocer las aportaciones de todas las personas que han contribuido a la realización del trabajo recogido en esta memoria.

A Carlos, por abrirme la puerta del laboratorio, por tu tutela en el desarrollo de este proyecto y por tu extraordinario compromiso, el cual nos sirve de ejemplo a todos.

A Jandro, por confiar en mí como tu posible sucesor y por tu comprensión en mis errores de principiante.

A Gloria, José Mari, Totó, Xose, Álvaro y Santi, por contribuir, ya desde la facultad, a mi formación científica, así como por vuestros acertados consejos.

A todos y cada uno de mis compañeros de laboratorio, por acogerme como soy y ayudarme desde el primer día con todos los problemas que fueron surgiendo.

A Inés, Jorge, Alina y Guillermo, por vuestra inestimable colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A todo el personal del animalario, de histología y de los servicios comunes, por el extraordinario trabajo que realizasteis y por vuestra disposición a ayudar en todo lo que estuviese en vuestra mano.

A mis amigos de Quintes, por esos buenos momentos, y a los compañeros de la facultad, especialmente a Alejandro, Mario y Laurix. Gracias Sarina por tu apoyo moral, y al resto de la banda Noega.

A toda mi familia, especialmente a mis tíos y primos, así como a mi hermana Celia, gracias por ser tan comprensiva conmigo. Gracias a mis padres, por hacer de puntales y sacrificaros todos los días por nosotros.

A mis *güeles*, Albina y Avelina. Gracias por vuestra simpatía y buen humor, y por poneros siempre de mi lado aunque no tuviese la razón. También a mi *güelu* Francisco, al cual no tuve la suerte de conocer, aunque me hubiese encantado hacerlo. Ya por último, quiero tener un reconocimiento especial con mi *güelu* Pepe. *Gracies por enseñame tantes cosas, gracies por dicime onde tan los nuegos oríxenes y por faceme partícipe d'un pasáu que dempués perdería contigo.*

A todos gracias.

ABREVIATURAS

Ago2: Proteína argonauta-2

BLM: Bleomicina

DGR8: *diGeorge critical region 8*

ESCs: Células embrionarias troncales

GTP: Guanosín trifosfato

IPF: Fibrosis pulmonar idiopática

MBSs: Sitios de unión de microRNAs

miRNAs: MicroRNAs

mRNAs: RNAs mensajeros

ncRNA: RNA no codificante

PACT: Protein activator of PKR

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

Pre-miRNA: Precursor de microRNA

Pri-miRNAs: MicroRNAs primarios

RISC: *RNA-induced silencing complex*

siRNA: RNA de interferencia pequeño

TC: Tomografía computerizada

TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante β 1

TRBP: Tar RNA binding protein

3'UTR: Región 3' no traducida

ÍNDICE

RESUMEN.....	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. Fibrosis.....	8
1.1.1 Fibrosis pulmonar idiopática (IPF).....	9
1.2. MicroRNAs.....	10
1.2.1 Biogénesis y mecanismos de acción de los miRNAs.....	11
1.2.2 Relevancia funcional de los miRNAs.....	14
1.2.3 miR-29.....	17
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
2.1 Cuidado de los animales.....	21
2.2 Diseño experimental.....	21
2.3 Análisis histológicos.....	22
2.4 Tomografía Computerizada (TC).....	22
2.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	22
2.5 Aislamiento de RNA.....	23
2.7 Análisis transcripcional mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real.....	23
2.8 Análisis bioinformático y estadístico.....	23
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
3.1 Caracterización fenotípica de ratones deficientes en miR-29.....	24
3.1.1 Ratones deficientes en miR-29a/b-1.....	24
3.1.2 Ratones deficientes en miR-29b-2/c.....	25
3.2 Fibrosis pulmonar en ratones deficientes en miR-29.....	25
4. CONCLUSIONES.....	27
5. BIBLIOGRAFÍA.....	28

RESUMEN

La fibrosis pulmonar idiopática (IPF) es una enfermedad crónica, letal, de naturaleza progresiva y etiología desconocida, que carece de un tratamiento eficaz. A pesar de los recientes avances llevados a cabo en el campo de los desórdenes fibróticos, los mecanismos moleculares desencadenantes de este tipo de patologías son, en su mayor parte, desconocidos. En la última década, los microRNAs (miRNAs) han emergido como unos importantes reguladores de la expresión génica. Estas moléculas se unen preferentemente a las regiones 3'UTR de los mRNAs promoviendo su degradación o inhibiendo su traducción. En la actualidad existen numerosas evidencias de que miR-29, una familia de miRNAs compuesta por tres miembros, juega un importante papel en la patogénesis de numerosas enfermedades, incluyendo las patologías fibróticas. Con el fin de evaluar las funciones fisiopatológicas que miR-29 desempeña en los organismos hemos generado ratones deficientes en los *clusters* a partir de los cuales se transcriben los tres miembros de esta familia. Además, hemos realizado un protocolo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en estos ratones mutantes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Fibrosis

La reparación de las heridas es un proceso biológico extremadamente complejo que se manifiesta, aunque de muy variables formas, en el reino animal. Tras el daño tisular, se activan componentes celulares del sistema inmune, la cascada de coagulación sanguínea y varias rutas de señalización proinflamatorias para restaurar la integridad y la homeostasis tisular [1]. La fibrosis es un proceso de cicatrización patológica característico de condiciones inflamatorias crónicas que conlleva la desorganización de la arquitectura del órgano afectado, constituyendo la principal causa de disfunción orgánica en el ser humano [2]. Se estima que los síndromes fibroproliferativos están implicados en un 45% de todos los casos de mortalidad que se registran en los EEUU [3].

La función de un órgano depende de que la red de tejido conectivo que lo conforma mantenga su topología para permitir el correcto ordenamiento de los componentes celulares. La fibrosis se caracteriza por la excesiva acumulación de los componentes de la matriz extracelular como el colágeno, la α -actina del músculo liso, la laminina, la elastina y la fibrilina los cuales juegan un importante papel en el desarrollo de esta patología. La acumulación de la matriz extracelular puede deberse a un aumento de la síntesis o a una disminución en la degradación de la misma [4]. Los miofibroblastos son las células efectoras de las diversas patologías fibróticas [5], ya que este tipo celular es el responsable de la síntesis de la matriz extracelular y de la remodelación tisular [6]. Es precisamente la incapacidad de terminar la respuesta reparadora, especialmente la acumulación y la activación de los miofibroblastos, la que podría conducir al desarrollo de reacciones fibróticas en tejidos dañados [7].

Los mecanismos fisiológicos de cicatrización de heridas son los encargados de iniciar el proceso fibrótico [8]. La cascada de coagulación es el primer mecanismo que

se pone en marcha tras la lesión tisular. Así, cuando se daña el endotelio, las plaquetas circulantes son activadas cuando entran en contacto con el colágeno y el factor de von Willebrand presentes en la capa subendotelial [9]. El factor de coagulación II (protrombina) sufre un procesamiento proteolítico para dar lugar a la trombina, una serín-proteasa que convierte el fibrinógeno soluble en hebras insolubles de fibrina, las cuales aglutinan a las plaquetas para formar el coágulo. Las plaquetas activadas liberan el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), un potente quimioatrayente para las células inflamatorias, así como el factor de crecimiento transformante (TGF- β 1), el cual estimula la biosíntesis de los componentes de la matriz extracelular por los fibroblastos locales [10]. Consecuentemente con todo lo anterior, una prolongación excesiva de esta respuesta fisiológica, con la citada acumulación de miofibroblastos senescentes y con resistencia a la apoptosis, puede terminar en una fibrosis [11, 12].

1.1.1 Fibrosis pulmonar idiopática (IPF)

La fibrosis pulmonar Idiopática (IPF) es una enfermedad crónica, letal, de naturaleza progresiva y etiología desconocida, que carece de un tratamiento eficaz [13]. Esta devastadora patología se caracteriza por una progresiva cicatrización de las regiones dedicadas al intercambio gaseoso en los pulmones, lo cual termina provocando la asfixia [14]. El proceso tiene lugar por el depósito en el intersticio pulmonar de colágenos y otras proteínas de la matriz extracelular, mediado por TGF- β 1 a través de sus proteínas reguladoras Smad2 y Smad3 [15]. Estudios recientes han demostrado que es Smad3, y no Smad2, el principal regulador de la fibrogénesis *in vivo* e *in vitro* [16]. Así, se ha definido la participación de Smad3 en varios modelos de enfermedad fibrótica, incluyendo fibrosis pulmonar inducida por bleomicina [17] y nefropatía obstructiva ureteral unilateral [18]. Sin embargo, el empleo de la ruta TGF- β 1/Smad3 como diana para el tratamiento de la fibrosis pulmonar resulta problemático, debido al importante papel de TGF- β 1 en el correcto balance de las respuestas inmunes [19].

1.2 MicroRNAs

Los microRNAs (miRNAs) constituyen un extraordinario sistema de regulación génica que había pasado desapercibido hasta hace aproximadamente una década. El dogma central de la Biología molecular, enunciado por Francis Crick en 1958 y redefinido posteriormente en 1970, establecía que la información biológica fluye unidireccionalmente desde el DNA hacia el RNA y las proteínas [20]. Esta visión otorgaba al RNA no codificante (ncRNA) un papel muy poco relevante, a pesar de que constituye alrededor del 98% de todo el transcriptoma humano [21].

Los primeros pasos que condujeron a la identificación de los miRNAs se llevaron a cabo en los laboratorios de Victor Ambros y Gary Ruvkun en los inicios de la década de los 90. Durante un estudio desarrollado por el propio grupo del Dr. Ambros y encaminado a buscar nuevos genes implicados en la transición de larva a adulto del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, se descubrió que el gen *lin-4* actuaba como represor del gen *lin-14*, éste último codificante de una proteína [22]. Ese mismo grupo clonó y caracterizó el citado gen *lin-4*, el cual carecía de los tradicionales codones de inicio y de parada de la traducción. Además, mutaciones en la hipotética pauta abierta de lectura no afectaban a su función [23]. Por su parte, el laboratorio del Dr. Ruvkun constató que *lin-14* era regulado post-transcripcionalmente mediante las repeticiones de su región 3' no traducida (3'UTR) [24]. Basándose en esta información, ambos laboratorios publicaron en 1993 la primera descripción de la existencia de los miRNAs. Este descubrimiento pasó inadvertido como un hecho aislado propio de la peculiar biología de los nemátodos, hasta que siete años después, el grupo del propio Ruvkun reveló la existencia de otro miRNA también en *C. elegans*, el gen *let-7*, y demostró su conservación evolutiva hasta humanos [25]. A raíz de este trabajo, varios laboratorios comenzaron una búsqueda exhaustiva de moléculas de RNA de pequeño tamaño en diversos organismos, que condujeron a la publicación simultánea en el año 2001 de tres estudios que describían la identificación de decenas de estas moléculas en nemátodos, moscas y humanos, y proponían la existencia de una nueva clase de RNAs reguladores de la expresión génica [26-28].

Todos estos hallazgos supusieron el inicio de la revolución de los miRNAs [29]. Desde entonces, nuestro conocimiento sobre estas moléculas ha crecido de forma exponencial y hoy sabemos que este sistema de regulación tiene un gran impacto en prácticamente cualquier proceso de la célula y del organismo [29]. La regulación génica por miRNAs es un mecanismo ampliamente extendido en vertebrados e invertebrados, así como en plantas, algas y virus, aunque ausente en hongos [30]. Esta peculiar distribución sugiere que los miRNAs surgieron de forma independiente en plantas y animales, y de hecho, presentan diferencias sustanciales en su maquinaria y sus mecanismos de acción en ambos tipos de organismos [31].

1.2.1 Biogénesis y mecanismos de acción de los miRNAs

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA de una sola hebra, de entre 19 y 24 nucleótidos de longitud, que se unen por complementariedad preferentemente a secuencias situadas en las regiones 3'UTR de sus RNA mensajeros diana (mRNAs) e inhiben la síntesis proteica mediante el bloqueo de la traducción o la degradación del mRNA [32]. Los miRNAs están codificados en el genoma, principalmente en regiones intergénicas, aunque también se encuentran en intrones de otros genes y, ocasionalmente, en el 3'UTR o en regiones codificantes [33]. La gran mayoría de miRNAs intergénicos presentan una estructura génica similar a la de cualquier gen codificante de proteínas, constituida por un promotor para la RNA polimerasa II con secuencias reguladoras, un cierto número de exones y una secuencia de poliadenilación. En el caso de los miRNAs intragénicos, la regulación de su expresión viene marcada por el promotor del gen hospedador, aunque en algunos casos se transcriben a partir de la hebra antisentido del gen y, por lo tanto, poseen sus propios mecanismos de regulación.

Tras su expresión en el núcleo como largos transcritos primarios (pri-miRNAs), los miRNAs deben sufrir un proceso de maduración para dar lugar al miRNA maduro (Figura 1). En este sentido, cabe destacar que, con frecuencia, los miRNAs se organizan en el genoma en grupos denominados *clusters*, transcritos como una sola molécula de RNA policistrónico que, posteriormente, origina varios miRNAs maduros. La primera

etapa de su maduración sucede en el núcleo, donde la región del transcrito primario que dará lugar al miRNA maduro adquiere una estructura secundaria en forma de lazo caracterizada por una región de unos 33 nucleótidos de RNA de doble hebra y un bucle terminal y unas regiones flanqueantes 5' y 3' de RNA de hebra simple. Esta estructura es reconocida por un complejo con actividad nucleasa formado por la RNAsa III Drosha y la proteína DGR8 (*diGeorge critical region 8*). Ambas proteínas poseen dominios de unión a RNA bicatenario que reconocen la estructura en forma de lazo y realizan un corte asimétrico en ambas hebras a 11 nucleótidos del comienzo de la región de doble hebra, generando lo que se conoce como precursor de miRNA (pre-miRNA). El procesamiento por el complejo Drosha/DGR8 acontece de forma simultánea a la transcripción y, en el caso de miRNAs intrónicos, se produce antes de que tenga lugar el ajuste de intrones. El pre-miRNA generado posee 2 nucleótidos protruyentes en su extremo 3', lo que permite su reconocimiento por el complejo exportina-5/Ran-GTP, que media su transporte al citoplasma donde continuará su maduración.

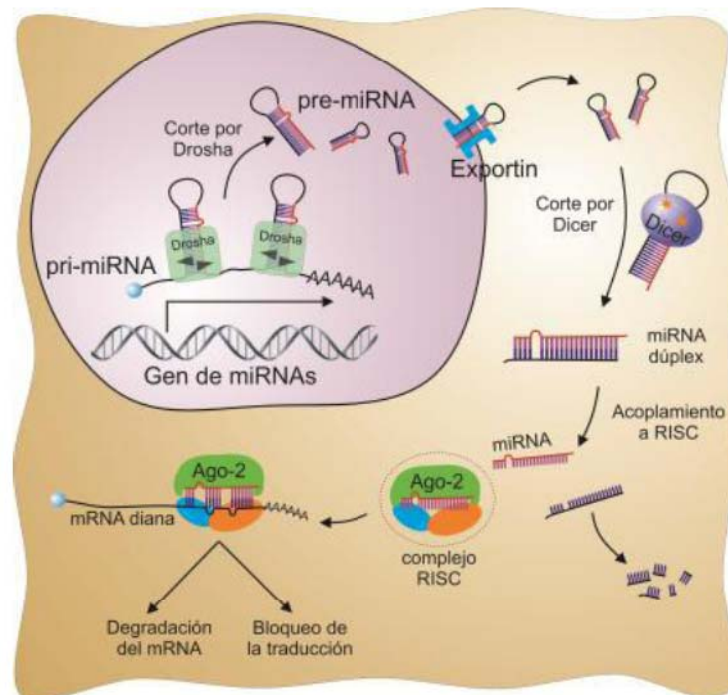


Figura 1: Biogénesis y mecanismos de acción de los microRNAs.

Una vez en el citoplasma, un complejo formado por la RNAasa III Dicer y las proteínas de unión a RNA de doble hebra TRBP (Tar RNA binding protein) y PACT (protein activator of PKR) realizan un segundo corte en el pre-miRNA, dando lugar a un RNA de doble hebra de unos 22 nucleótidos con extremos 3'-protruyentes denominado miRNA dúplex. Posteriormente, este dúplex se une al complejo de silenciamiento o RISC (RNA-induced silencing complex), cuyo principal efector es la proteína argonauta-2 (Ago2). La unión a este complejo desencadena la degradación de la hebra pasajera y el acoplamiento de la hebra funcional (complementaría al mRNA), que constituye ya el miRNA maduro y se encargará de guiar al complejo de silenciamiento hacia los mRNAs diana. Aunque en principio el miRNA dúplex podría dar lugar a dos miRNAs maduros, solo una de las hebras es seleccionada por el complejo RISC y, normalmente, es aquella que muestra mayor estabilidad en su extremo 5' [34].

El reconocimiento de los mRNAs diana y los mecanismos de silenciamiento mediados por RISC difieren entre plantas y animales [35]. En plantas, los miRNAs presentan un mecanismo de acción similar a los siRNA, uniéndose a secuencias perfectamente complementarias situadas en las regiones codificantes de los mRNAs y desencadenando su degradación. Sin embargo, en animales, el mecanismo es mucho más complejo, ya que los miRNAs se unen a secuencias parcialmente complementarias situadas en las regiones 3'UTR de los mRNAs, existiendo tres posibilidades de silenciamiento: la degradación directa del mensajero, su desadenilación y posterior degradación por mecanismos generales de la célula o la inhibición de su traducción a proteínas [36]. La complementariedad parcial entre el mRNA y el miRNA es uno de los aspectos que más ha obstaculizado el avance en el conocimiento de las funciones de los miRNAs en animales, debido a que no parece ajustarse a un único patrón, lo que imposibilita la deducción de los genes diana de los miRNA usando metodologías sencillas de alineamiento de secuencias, tal como sucede en plantas. No obstante, el conocimiento adquirido en los últimos años ha puesto de manifiesto que una región clave de los miRNAs en el reconocimiento de los genes diana es la denominada región semilla (del inglés "seed"), correspondiente a los 9 primeros nucleótidos del extremo 5' [37]. Así, se ha comprobado que los sitios de unión de miRNAs (MBSs) más comunes en los mRNAs son aquellos que presentan complementariedad continuada con al

menos 7 nucleótidos de la región semilla del miRNA. Aunque menos frecuentes, también existen MBSs funcionales con tan solo 6 nucleótidos emparejados con la región semilla e incluso algunos poseen discontinuidades en la complementariedad de dicha región que son compensadas con un extenso alineamiento en la región 3'. Consecuentemente, la predicción de genes diana usando estos determinantes es una tarea compleja que implica la obtención de un gran número de falsos positivos derivados de la elevada probabilidad de encontrar al azar una secuencia de seis nucleótidos complementaria a la región semilla [38]. Para reducir el número de falsos positivos, se han desarrollado programas de predicción que utilizan la información de conservación entre especies bajo la hipótesis de que los MBSs funcionales estarán sometidos a presiones selectivas y por lo tanto aparecerán en varias especies con mayor probabilidad que por azar [39]. De igual modo, otros programas incorporan parámetros como la presencia de varios MBSs en el mismo gen, la energía termodinámica del alineamiento, la compensación del emparejamiento en el extremo 3' o la estructura secundaria del mRNA, para lograr el mejor compromiso entre sensibilidad y fiabilidad.

1.2.2 Relevancia funcional de los miRNAs

Independientemente del tipo de mecanismo de silenciamiento, el resultado final de la acción de los miRNAs es una disminución en los niveles de las proteínas codificadas por los genes diana. De esta manera, los miRNAs pueden actuar bien como interruptores, encendiendo o apagando una determinada ruta, como elementos moduladores adicionales a la regulación de la expresión génica, o formando bucles de retroalimentación [38]. Teniendo en cuenta que cada miRNA tiene el potencial de regular entre decenas y cientos de genes, y considerando que se han identificado casi 2000 miRNAs en el genoma humano (<http://mirbase.org/>) y que un mismo gen puede presentar sitios de unión para varios miRNAs, se estima que aproximadamente un 60% del transcriptoma humano está regulado por estas pequeñas moléculas, por lo que no es de extrañar su influencia en los programas celulares [40]. En este sentido, otro estudio ha revelado que más del 50% de los transcritos de mamíferos están sometidos a presiones selectivas dirigidas a la conservación de sus MBSs [41]. Por otra parte,

dado el elevado número de dianas que presentan, un mismo miRNA puede causar un gran impacto en única ruta celular mediante la intervención a varios niveles, o controlar múltiples procesos simultáneamente. Así, para algunos miRNAs se han encontrado relaciones funcionales entre sus genes diana, lo que sugiere su especialización en un proceso concreto. Un ejemplo son los miRNAs miR-6 y miR-11, ambos pertenecientes a la familia de miR-2, los cuales funcionan cooperativamente para limitar el nivel de apoptosis en el desarrollo embrionario de *Drosophila*. Las dianas de estos miRNAs muestran un claro enriquecimiento en genes proapoptóticos a los cuales regulan de manera efectiva, ya que los individuos que carecen de estos dos miRNAs muestran letalidad embrionaria [42]. Sin embargo, es frecuente que los miRNAs no presenten conexiones evidentes entre sus genes diana, lo que parece indicar que pueden desempeñar múltiples funciones dependiendo del tejido o del momento en el que se expresen. Otro aspecto a tener en cuenta en este sistema de regulación es la redundancia funcional que ocurre entre miRNAs que comparten la misma región semilla o entre miRNAs que presentan varias copias idénticas con distinta localización genómica. Por lo tanto, en un escenario como este, se puede concluir que cualquier proceso celular es susceptible de cierto grado de regulación por miRNAs en algún tipo celular o en alguna condición concreta.

Como se ha mencionado, una de las principales funciones atribuidas a los miRNAs ya desde el descubrimiento de *lin-4* es la regulación del desarrollo embrionario. De hecho, ratones deficientes en cualquiera de los genes implicados en la ruta biosintética de miRNAs, como Droscha, Dicer, DGR8 o Ago2, mueren prematuramente con graves defectos en su morfogénesis [43]. La generación de modelos murinos deficientes en miRNAs individuales o en *clusters* de los mismos ha aportado una valiosa información acerca del impacto real de los miRNAs en la biología de los organismos y ha confirmado su importante contribución a los procesos de programación celular que acontecen durante el desarrollo embrionario. Aunque actualmente el número de modelos murinos deficientes en miRNAs es todavía reducido, dicho número va en aumento. Además, estos estudios también han confirmado los fenómenos de redundancia o cooperación funcional entre miRNAs relacionados o coexpresados. Así, los ratones deficientes en miR-133a-1 o miR-133a-2, dos copias idénticas del mismo

miRNA, no muestran ningún fenotipo obvio, mientras que la ausencia simultánea de ambos origina letalidad perinatal en aproximadamente el 50% de los casos, asociada a severos defectos cardiacos [44]. De forma similar, el *cluster* miR-17~92 presenta otros dos *clusters* parálogos, el miR-106a~363 y el miR-106b~25, sumando entre todos 15 miRNAs de 4 familias distintas. Mientras que la ausencia de cualquiera de los dos últimos *clusters* no produce ningún fenotipo aparente, su deficiencia combinada la de miR-17~92 agrava en gran medida su fenotipo provocando letalidad ya en etapas muy tempranas del desarrollo [45]. En cualquier caso, también hay un número significativo de modelos de pérdida de función de miRNAs que no desarrollan fenotipos graves ni altamente penetrantes bajo condiciones controladas, a pesar de su importante conservación evolutiva [46, 47].

Acorde con su profundo impacto en la biología de los organismos, diversas alteraciones en los sistemas de regulación mediados por miRNAs se asocian frecuentemente al desarrollo de patologías humanas, entre las que destacan enfermedades neurodegenerativas y el cáncer [48, 49]. La contribución de este sistema de regulación a la tumorigénesis se ha estudiado extensamente en los últimos años y ha revelado un papel fundamental de los miRNAs en esta patología. Los miRNAs pueden participar en desarrollo del cáncer como supresores tumorales o como oncogenes a través de cambios en su expresión, variación en el número de copias, mutaciones en sus secuencias o en los MBSs de sus genes diana, o alteraciones en los mecanismos de biogénesis [50]. Así, algunos estudios señalan que más del 50% de los miRNAs se encuentran situados en regiones genómicas asociadas al desarrollo del cáncer o cercanos a puntos de rotura cromosómica. En este sentido, en algunos tipos de cáncer, los patrones de expresión de miRNAs se han revelado como una herramienta de clasificación tumoral más efectiva que los perfiles de expresión de mRNAs, lo que ha convertido a los miRNAs en biomarcadores útiles para el diagnóstico y pronóstico del cáncer, permitiendo diferenciar el tejido tumoral del sano o determinar el origen, grado de diferenciación, potencial metastásico o la respuesta a tratamientos antitumorales. Por otro lado, varios trabajos iniciales revelaron la existencia de mutaciones en genes implicados en la biosíntesis de miRNAs en un abundante número de tumores.

Por otra parte, cabe señalar que el elevado número de genes diana de cada miRNA, su impacto en los procesos celulares y su frecuente contribución a diversas patologías ha llevado a su consideración como posibles dianas terapéuticas para el tratamiento de diversas enfermedades y, especialmente, el cáncer. Aunque todavía nos encontramos en los inicios de estas aproximaciones, varios trabajos en ratones y primates han conseguido modificar sustancialmente los niveles de miRNAs utilizando oligonucleótidos que mimetizan o bloquean la acción de los miRNAs endógenos [51].

En conclusión, el descubrimiento de los miRNAs ha supuesto un hito en la historia de la ciencia al añadir un nuevo nivel de regulación molecular que podría permitirnos explicar muchos aspectos de la biología de los organismos que permanecían sin respuesta. Aunque el conocimiento adquirido durante los últimos años ha aportado pruebas evidentes sobre su profundo impacto en la biología de los mamíferos, todavía existen muchos interrogantes en torno a la regulación por miRNAs, y será necesario reevaluar la contribución que este sistema de regulación desempeña en los distintos procesos fisiológicos y patológicos de los organismos.

1.2.3 miR-29

A raíz del enorme auge del estudio de la regulación mediada por miRNAs, y dada la experiencia previa de nuestro laboratorio en el estudio de las bases moleculares del envejecimiento [52], nuestro grupo inició recientemente una línea de investigación que abordaba el estudio de la contribución de estas moléculas al citado proceso. Con este fin, empleamos un modelo de ratón desarrollado en nuestro laboratorio que manifiesta envejecimiento acelerado (ratones progeroides) para analizar los cambios en los niveles de expresión del conjunto de miRNAs murinos durante el envejecimiento [53, 54]. Estos análisis revelaron importantes cambios de expresión en varios miRNAs durante el envejecimiento acelerado, algunos de los cuales están también alterados en el envejecimiento fisiológico [55, 56]. El estudio detallado de estos miRNAs permitió la identificación de varios de sus genes diana y reveló que estos miRNAs tenían la capacidad de regular diversas rutas bioquímicas asociadas al envejecimiento. Por

ejemplo, hemos demostrado que el aumento en los niveles de miR-1 contribuye a la desregulación del eje somatotrofo presente en estos ratones a través de la represión de la síntesis de IGF-1 [55]. Igualmente, hemos identificado altos niveles de expresión de los tres miRNAs que componen la familia de miR-29 durante el envejecimiento fisiológico y patológico, y hemos demostrado que estos miRNAs regulan la proliferación y senescencia celular mediante la modulación de la respuesta a daño en el DNA [56]. La familia de miR-29 se compone de miR-29a, miR-29c y dos copias de miR-29b, organizados en dos regiones genómicas o *clusters*. Así, el *cluster* mir-29a/b-1 presente en el cromosoma 6 de ratón codifica miR-29a y miR-29b-1, mientras que miR-29c y miR-29b-2 se originan a partir del *cluster* miR-29b-2/c presente en el cromosoma 1 [57].

Además, en la actualidad existen numerosas evidencias de que miR-29 juega un importante papel en la patogénesis de numerosas enfermedades, incluyendo los desórdenes fibróticos [58]. Concretamente, su papel como inhibidor del desarrollo de la fibrosis es su efecto biológico mejor documentado hasta el momento, ya que se ha relacionado a esta familia de miRNAs con la fibrosis hepática [59], renal [60], cutánea [61], cardíaca [62] y con el aneurisma de aorta [63], así como con la fibrosis pulmonar Idiopática. No en vano, los genes más importantes que conforman la matriz extracelular (*ELN, FBN1, COL1A1, COL1A2, Col3A1...*), son dianas moleculares de la familia miR-29 [62, 64]. Como ya se ha comentado, numerosos estudios han demostrado que miR-29 muestra una expresión reducida o incluso nula en numerosos desórdenes fibróticos. Sin embargo, poco ha sido lo que se ha explorado sobre el potencial terapéutico de esta familia de miRNAs. Además, recientemente, se ha probado que miR-29 es regulado por el eje TGF- β 1/Smad3, ya que los ratones deficientes en Smad3 están protegidos frente a la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, con lo cual se propone que este miRNA constituye un agente antifibrótico. Más aún, la terapia génica empleando miR-29 inhibe el desarrollo de la fibrosis pulmonar inducida por el citado compuesto [65].

Sobre la base de los citados estudios nos planteamos continuar con estas líneas de investigación, con el objetivo de dilucidar las funciones fisiopatológicas que la familia

miR-29 desempeña en los organismos, para lo cual hemos generado ratones modificados genéticamente deficientes en miR-29. Dada la redundancia funcional de esta familia de miRNAs, se han generado ratones deficientes en ambos *clusters*, lo cual está permitiendo estudiar la contribución de cada uno por separado, así como la generación de ratones deficientes en todos los miembros de la familia.

Los ratones mutantes deficientes en miR-29 se obtuvieron a partir de células embrionarias (ES) murinas deficientes en los *clusters* miR-29a/b-1 y miR-29b-2/c respectivamente, cedidas por el Dr. Haydn M. Prosser (Cambridge, Reino Unido). Estas células fueron generadas, en ambos casos, mediante recombinación homóloga empleando el vector de reemplazamiento puDeltatk (Figura 2).

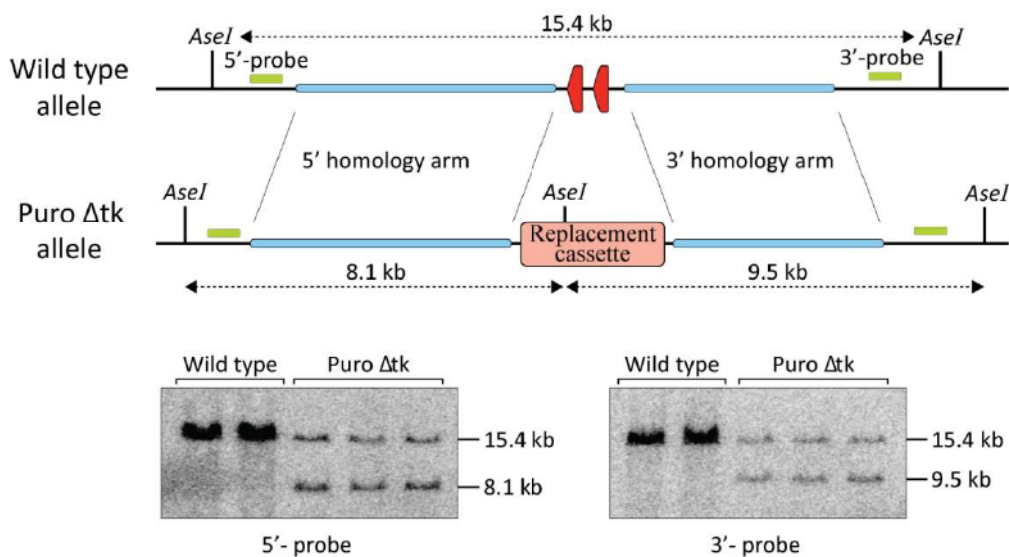


Figura 2: Estrategia de reemplazamiento de un *cluster* de miRNAs (en rojo). Abajo, *Southern blot* donde se corrobora la presencia del alelo puDeltatk en células ES.

Las células ES proporcionadas por el Dr. Prosser portaban el *cassette* de reemplazamiento, el cual debe ser eliminado por escisión evitando así que puedan producirse artefactos debido a que la presencia del mismo pueda interferir en la biología de los ratones. Con este fin se procedió a sobreexpresar la recombinasa Cre en las células ES murinas heterocigotas para el alelo puDeltatk, de manera que el

cassette se escindiese debido a la acción de este enzima sobre los sitios LoxP (Figura 3).

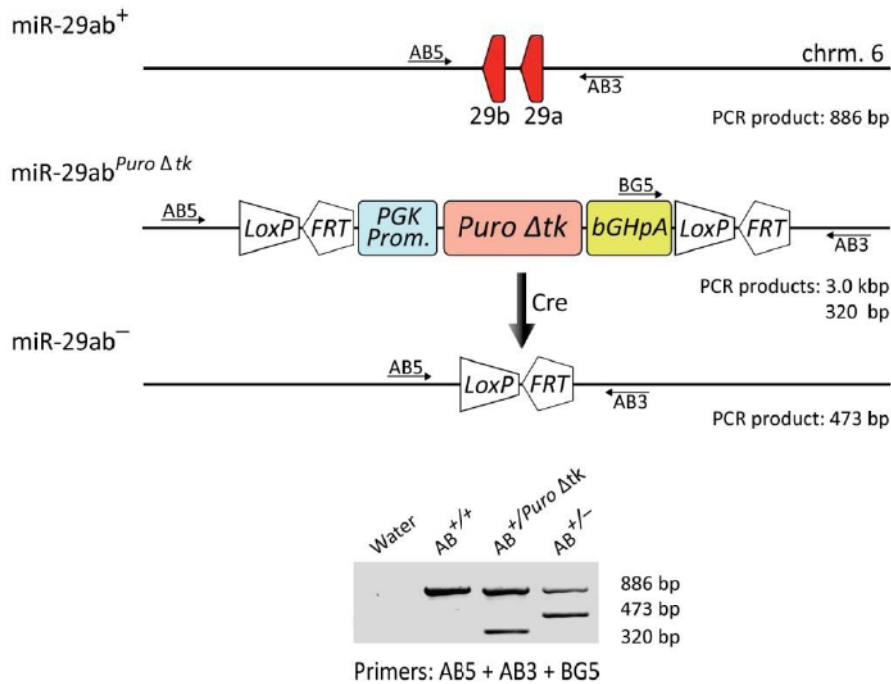


Figura 3: Esquema donde se representa la escisión del alelo puDeltatk debido a la acción de la recombinasa Cre sobre los sitios LoxP.

Una vez tuvo lugar la escisión, se procedió a la microinyección de las ES murinas heterocigotas en blastocistos C57BL/6J, lo cual fue realizado por la Unidad de Transgénicos del IUOPA. De esta forma se generaron las primeras quimeras, las cuales se cruzaron con ratones silvestres de la misma cepa. Aquellas quimeras que presentaban transmisión a la línea germinal del alelo mutante produjeron la generación F1, la cual estaba compuesta por individuos silvestres e individuos heterocigotos. Cruzando los heterocigotos entre sí logramos obtener las líneas de ratón deficientes en miR-29a/b-1 y miR-29b-2/c. Para la generación del doble *Knock-out* (KO) es necesario cruzar ambas líneas entre sí, proceso que se está desarrollando actualmente.

Dados estos antecedentes, en el presente Trabajo Fin de Máster nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

- Establecimiento de las colonias de ratones deficientes en miR-29a/b-1 y miR-29b-2/c, así como el doble *knock-out*, mediante cruces dirigidos de manera que se generen grupos de ratones con genotipos útiles para la experimentación.
- Caracterización de los cambios fenotípicos de los ratones deficientes en los *clusters* de miR-29.
- Evaluación de la relevancia *in vivo* de la familia miR-29 en la fibrosis pulmonar inducida en ratones mediante el empleo de bleomicina.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Cuidado de los animales

Se emplearon ratones, tanto de genotipo silvestre como deficientes en los *clusters* miR-29a/b-1 y miR-29b-2/c, pertenecientes a la cepa C57BL/6J con una edad comprendida entre las 23 y las 25 semanas. Durante el proceso, los ratones se mantuvieron en las instalaciones especializadas del bioterio de la Universidad de Oviedo bajo un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, siendo alimentados *ad libitum*. Los genotipos fueron confirmados por PCR. El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Oviedo.

2.2 Diseño experimental

Los ratones de todos los genotipos se clasificaron aleatoriamente en dos grupos, el primero de ellos fue tratado con bleomicina y el segundo con PBS (del inglés,

Phosphate buffered saline). Una vez anestesiados los animales con una mezcla de ketamina-xilacina, se les practicó una pequeña incisión en la línea media del cuello para exponerles la tráquea. Acto seguido se les administró, vía intratraqueal, bleomicina (2 Unidades/Kg) o PBS empleando una aguja de 29G. A continuación, se suturó la abertura y se dejó a los animales recuperarse. Los ratones se sacrificaron a los 3 y 21 días después de la correspondiente inyección intratraqueal. En total se han establecido 10 grupos distintos dependiendo del genotipo, tratamiento y tiempo de sacrificio desde la instilación, con un total de 55 animales.

2.3 Análisis histológicos

El pulmón izquierdo se fijó empleando formaldehído al 4%. Se estudiaron tres cortes por cada pulmón, cada uno a una altura diferente, teñidos con Hematoxilina-eosina o con Tricrómico de Masson, una tinción que permite identificar los depósitos de colágeno. La fibrosis se valoró según la escala de Ashcroft [66], la cual otorga puntuaciones que van desde 0 (no fibrosis) hasta 8 (fibrosis masiva en todos los campos), también se valoró el grado de inflamación [67]. Las evaluaciones patológicas se realizaron sin conocer los genotipos y las condiciones experimentales de cada muestra.

2.4 Tomografía computerizada

Para la adquisición de imágenes por tomografía computerizada se realizó en el Laboratorio de Imagen Preclínica del Bioterio de la Universidad de Oviedo empleando el equipo Argus PET/CT (Sedecal).

2.5 Reacción en cadena de la polimerasa

Los experimentos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para determinar los genotipos de los animales se efectuaron en termocicladores de Perkin Elmer (modelo 9700) y Applied Biosystems (modelo Verity), indistintamente. Los oligonucleótidos

específicos para la amplificación se diseñaron de acuerdo con la secuencia a amplificar. Los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa en TBE.

2.6 Aislamiento de RNA

Los tejidos extraídos de los animales se congelaron inmediatamente a -80°C . Para la extracción de RNA se empleó el método de Trizol (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los precipitados de RNA se resuspendieron en agua libre de RNAsas (Ambion, Austin, TX, USA), y la cantidad de RNA se cuantificó y su pureza se evaluó mediante la relación de absorbancia 260/280nm, empleando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

2.7 Análisis transcripcional mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real

La determinación de los niveles relativos de cada miRNA se realizó mediante RT-PCR a tiempo real utilizando “Taqman Small RNA assays” (Applied Biosystems). Para ello, se generó cDNA de doble hebra a partir de 10 ng de RNA total mediante el kit de transcripción reversa “Taqman miRNA reverse transcription kit” (Applied Biosystems). El cDNA resultante se amplificó mediante PCR a tiempo real en un sistema de detección “7300 Real-Time PCR System” (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se analizaron mediante cuantificación relativa frente al control endógeno snoRNA202 empleando el Software SDS 1.4 y 2.1 de Applied Biosystems.

2.8 Análisis bioinformático y estadístico

La predicción computacional de las dianas de miRNA se realizó mediante la combinación de los siguientes programas bioinformáticos: TargetScan (www.targetscan.org), Microcosm (www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm) y PicTar (pictar.mdc-berlin.de). Para el análisis estadístico de los datos experimentales se emplearon el programa GraphPad Prism así como Excel del paquete Microsoft Office. Los datos experimentales se muestran como el valor medio

calculado a partir de los mismos, y las barras de error representan el error estándar de la media.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización fenotípica de los ratones deficientes en miR-29

Nuestro primer objetivo consistió en la caracterización de los cambios fenotípicos que experimentan los ratones deficientes en miR-29a/b-1 y miR-29b-2/c, así como los del doble *KO*. Sin embargo, para la generación del citado ratón deficiente en todos los miembros de la familia miR-29 fue necesario establecer varios cruces dirigidos entre los ratones deficientes en ambos *clusters*, proceso que aún no ha finalizado, debido a lo cual no ha podido ser tratado en la presente memoria.

3.1.1 Ratones deficientes en miR-29a/b-1.

La generación de ratones deficientes en el *cluster* miR-29a/b-1, así como su caracterización fenotípica preliminar ya han sido descritas en el año 2012 por Smith y colaboradores [68]. En este artículo se propone a miR-29 como un regulador de la diferenciación de los linfocitos T por medio de un bucle de retroalimentación que implica a T-bet e IFN- γ . En ese mismo artículo también se describe superficialmente la generación de ratones deficientes en el *cluster* miR-29b-2/c

La generación de estos ratones va a permitir el establecimiento de las dianas moleculares de miR-29 que se encuentran desreguladas en los ratones mutantes. Así como diferenciar las dianas funcionales reales a las cuales miR-29 controla directamente, de aquellas que se desregulan de forma secundaria debido a la alteración de las primeras.

3.1.2 Ratones deficientes en miR-29b-2/c.

Se han generado los ratones deficientes en miR-29b-2/c. No obstante, hay que destacar que nuestro laboratorio y otros grupos [68], han puesto de manifiesto que miR-29b se transcribe mayoritariamente a partir del *cluster* miR-29a/b-1, de modo que los ratones deficientes en el citado *cluster* no muestran prácticamente expresión de miR-29a, ni de miR-29b.

Esta peculiar expresión de miR-29b podría contribuir a explicar los cambios fenotípicos de los ratones deficientes el *cluster* miR-29a/b-1, ya que estos animales prácticamente sólo expresan miR-29c.

3.2 Fibrosis pulmonar en ratones deficientes en miR-29

Con el fin de evaluar el papel que la familia de microRNAs miR-29 desempeña en el desarrollo de la fibrosis pulmonar, los ratones deficientes en cada uno de los *clusters* que componen esta familia se sometieron a tratamiento con bleomicina. La bleomicina es un antibiótico antineoplásico, inicialmente aislado de *Streptomyces verticillatus* [69], que presenta una fuerte actividad frente a bacterias y hongos, pero su potente citotoxicidad ha impedido que se aplique como tratamiento frente a estas infecciones. No obstante, este compuesto se emplea como tratamiento para determinados tipos de cáncer, como linfomas, tumores de cabeza y cuello y tumores de las células germinales [70]. Sin embargo, se ha observado que la bleomicina presenta toxicidad pulmonar, según la dosis aplicada, que termina desencadenando fibrogénesis en dicho órgano. Así, el tratamiento de ratones con bleomicina es el modelo de estudio de la fibrosis pulmonar más empleado en la actualidad [71]. Existen varias formas de administrar la bleomicina a los animales, en nuestro caso hemos realizado una instilación intratraqueal, de modo que inicialmente se produce daño en el epitelio alveolar, lo cual provoca una alveolitis caracterizada por el reclutamiento y activación de neutrófilos y linfocitos que se prolonga durante los 7 días posteriores a la administración del compuesto [72]. Tras esta fase del proceso, las células inflamatorias son eliminadas y se produce una activación y proliferación de los fibroblastos locales, con la correspondiente síntesis de la matriz extracelular [73]. En nuestro caso hemos realizado el tratamiento con bleomicina a ratones deficientes en miR-29a/b-1 y en miR-29b-2/c, así como a ratones controles de genotipo silvestre. Como control del procedimiento experimental hemos

empleado animales deficientes en miR-29b-2/c y de genotipo silvestre, los cuales fueron instilados con PBS, no desarrollando, en ningún caso, patologías fibróticas.

La fibrosis se caracteriza por la excesiva acumulación de los componentes de la matriz extracelular en el tejido conjuntivo de diversos órganos como corazón, riñón, hígado y pulmón [4]. La mayoría de los genes que codifican a las proteínas que se acumulan en la matriz extracelular (colágenos, elastina, fibrilina...) son dianas moleculares de la familia miR-29 (<http://www.targetscan.org/>). Además, el eje TGF- β /Smad está considerado como clave en el desarrollo de la fibrosis pulmonar, siendo sus niveles controlados por miR-29 [74]. Recíprocamente, un estudio reciente ha puesto de manifiesto que TGF- β regula la expresión de miR-29 a través de Smad3, una de sus proteínas efectoras [65]. En ese mismo trabajo se ha propuesto a miR-29 como un potente agente antifibrótico *in vivo*, debido a que su empleo en terapia génica mediada por el transposón *Sleeping Beauty* (SB) inhibe en gran medida el desarrollo de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina. A pesar de todo lo anterior, en la actualidad no existen terapias para el tratamiento de la fibrosis pulmonar que actúen sobre esta ruta bioquímica.

Por otra parte, ya se ha comentado que miR-29 presenta una expresión reducida o nula en numerosos desórdenes fibróticos, por lo que este microRNA ha sido propuesto también como un biomarcador de este tipo de patologías. Por ejemplo, los niveles en orina de miR-29, junto con los de otros dos miRNAs, se correlacionan con proteinuria y función renal [75]. En la misma línea, otro trabajo ha puesto de manifiesto que nivel de expresión de miR-29c detectado en exosomas en la orina se correlaciona con la función renal o con el grado histológico de fibrosis en dicho órgano [76]. Asimismo, los niveles de miR-29a circulante se correlacionan con el nivel de fibrosis presente en pacientes con cardiomiopatía hipertrófica [77]. Todos estos trabajos arrojan la evidencia de que miR-29 podría resultar una herramienta útil para el diagnóstico de este tipo de patologías.

En la presente memoria se describe, por primera vez, la realización de un experimento de inducción de fibrosis pulmonar en ratones deficientes en miR-29. En este caso se ha realizado el experimento en ratones deficientes en uno de los dos *clusters* genómicos que forman la familia miR-29: mir-29a/b-1 y miR-29b-2/c, respectivamente. Este diseño experimental nos permitió evaluar la contribución de cada uno de los *clusters* al desarrollo de la patología.

Sin embargo, son muchas las cuestiones que quedan por resolver. Actualmente, se han propuesto dos posibles mecanismos a través de los cuales miR-29 podría ejercer su acción

antifibrótica. En primer lugar, miR-29 puede ejercer una regulación directa de la expresión de los genes que conforman la matriz extracelular, como es el caso de los colágenos, mediante su unión, preferentemente, a las regiones 3'UTR de sus mRNA. Además, miR-29 puede reducir la expresión de los citados genes de manera indirecta a través de la inhibición del eje TGF- β 1/Sma3, impidiendo así que se desencadene su cascada de señalización profibrótica. Nuestro modelo puede contribuir a despejar este interrogante, ya que se podría cuantificar el grado de expresión de TGF- β 1 a nivel proteico y de mRNA, y compararlo entre ratones de genotipo silvestre y mutante.

Por otra parte, en la actualidad no existen datos cuantitativos de los niveles de expresión de todos los miembros de la familia miR-29 en pulmones de pacientes con fibrosis pulmonar idiopática (IPF). Para tal fin podrían emplearse muestras embebidas en parafina [78], o incluso extraer los miRNAs de condensado exhalado, un técnica no invasiva que permite obtener líquido alveolar [78]. Así, la extracción de miRNAs a partir del condensado exhalado podría constituir una eficaz herramienta diagnóstica no invasiva para la fibrosis pulmonar idiopática.

Por último, los avances conseguidos en los últimos años en el empleo de microRNAs con fines terapéuticos podrían suponer una posibilidad de tratamiento para los pacientes con fibrosis pulmonar idiopática. Existen varios métodos de administración de miRNAs *in vivo*, pero uno de los que mayores ventajas presenta es el mediado por transposones, el cual está exento de los problemas de inmunogenicidad que poseen los virus. Además, el reciente éxito de una terapia génica mediada por transposones a través de la cual se aumentaron los niveles de miR-29 en pulmones de ratones, y se inhibió el desarrollo de la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina [65], pone de manifiesto el potencial terapéutico de esta familia de miRNAs.

4. CONCLUSIONES

- Se han generado ratones deficientes en miR-29a/b-1 y miR-29b-2/c y se ha procedido a la caracterización de sus cambios fenotípicos
- Se ha realizado un protocolo de fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en los citados ratones mutantes.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Gurtner, G.C., et al., *Wound repair and regeneration*. Nature, 2008. 453(7193): p. 314-21.
2. Zeisberg, M. and R. Kalluri, *Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 1. Common and organ-specific mechanisms associated with tissue fibrosis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2013. 304(3): p. C216-25.
3. Wynn, T.A., *Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(8): p. 583-94.
4. Wynn, T.A., *Cellular and molecular mechanisms of fibrosis*. J Pathol, 2008. 214(2): p. 199-210.
5. Hinz, B., et al., *The myofibroblast: one function, multiple origins*. Am J Pathol, 2007. 170(6): p. 1807-16.
6. Duffield, J.S., et al., *Host responses in tissue repair and fibrosis*. Annu Rev Pathol, 2013. 8: p. 241-76.
7. Thannickal, V.J., et al., *Mechanisms of pulmonary fibrosis*. Annu Rev Med, 2004. 55: p. 395-417.
8. Wynn, T.A. and T.R. Ramalingam, *Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease*. Nat Med, 2012. 18(7): p. 1028-40.
9. Esmon, C.T., *The interactions between inflammation and coagulation*. Br J Haematol, 2005. 131(4): p. 417-30.
10. Barrientos, S., et al., *Growth factors and cytokines in wound healing*. Wound Repair Regen, 2008. 16(5): p. 585-601.
11. Chambers, R.C., *Procoagulant signalling mechanisms in lung inflammation and fibrosis: novel opportunities for pharmacological intervention?* Br J Pharmacol, 2008. 153 Suppl 1: p. S367-78.
12. Hecker, L., et al., *Reversal of persistent fibrosis in aging by targeting Nox4-Nrf2 redox imbalance*. Sci Transl Med, 2014. 6(231): p. 231ra47.
13. Noble, P.W., et al., *Pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (CAPACITY): two randomised trials*. Lancet, 2011. 377(9779): p. 1760-9.
14. Barkauskas, C.E. and P.W. Noble, *Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis. 7. New insights into the cellular mechanisms of pulmonary fibrosis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2014.
15. du Bois, R.M., *Strategies for treating idiopathic pulmonary fibrosis*. Nat Rev Drug Discov, 2010. 9(2): p. 129-40.
16. Roberts, A.B., et al., *Smad3: a key player in pathogenetic mechanisms dependent on TGF-beta*. Ann N Y Acad Sci, 2003. 995: p. 1-10.
17. Zhao, J., et al., *Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. 282(3): p. L585-93.
18. Sato, M., et al., *Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction*. J Clin Invest, 2003. 112(10): p. 1486-94.
19. Shull, M.M., et al., *Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease*. Nature, 1992. 359(6397): p. 693-9.
20. Crick, F., *Central dogma of molecular biology*. Nature, 1970. 227(5258): p. 561-3.
21. Mattick, J.S., *Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity*. EMBO Rep, 2001. 2(11): p. 986-91.

22. Ambros, V., *A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in C. elegans*. Cell, 1989. **57**(1): p. 49-57.
23. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
24. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. Cell, 1993. **75**(5): p. 855-62.
25. Pasquinelli, A.E., et al., *Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA*. Nature, 2000. **408**(6808): p. 86-9.
26. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Science, 2001. **294**(5543): p. 853-8.
27. Lau, N.C., et al., *An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans*. Science, 2001. **294**(5543): p. 858-62.
28. Lee, R.C. and V. Ambros, *An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans*. Science, 2001. **294**(5543): p. 862-4.
29. Cech, T.R. and J.A. Steitz, *The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones*. Cell, 2014. **157**(1): p. 77-94.
30. Griffiths-Jones, S., et al., *miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature*. Nucleic Acids Res, 2006. **34**(Database issue): p. D140-4.
31. Jones-Rhoades, M.W., D.P. Bartel, and B. Bartel, *MicroRNAs and their regulatory roles in plants*. Annu Rev Plant Biol, 2006. **57**: p. 19-53.
32. Winter, J., et al., *Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(3): p. 228-34.
33. Krol, J., I. Loedige, and W. Filipowicz, *The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay*. Nat Rev Genet, 2010. **11**(9): p. 597-610.
34. Schwarz, D.S., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. Cell, 2003. **115**(2): p. 199-208.
35. Huntzinger, E. and E. Izaurralde, *Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(2): p. 99-110.
36. Pasquinelli, A.E., *MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship*. Nat Rev Genet, 2012. **13**(4): p. 271-82.
37. Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. Cell, 2005. **120**(1): p. 15-20.
38. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. **136**(2): p. 215-33.
39. Grimson, A., et al., *MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing*. Mol Cell, 2007. **27**(1): p. 91-105.
40. Peterson, S.M., et al., *Common features of microRNA target prediction tools*. Front Genet, 2014. **5**: p. 23.
41. Friedman, R.C., et al., *Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs*. Genome Res, 2009. **19**(1): p. 92-105.
42. Ge, W., et al., *Overlapping functions of microRNAs in control of apoptosis during Drosophila embryogenesis*. Cell Death Differ, 2012. **19**(5): p. 839-46.
43. Park, C.Y., Y.S. Choi, and M.T. McManus, *Analysis of microRNA knockouts in mice*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(R2): p. R169-75.
44. Liu, H., et al., *Systematic review: the safety and efficacy of growth hormone in the healthy elderly*. Ann Intern Med, 2007. **146**(2): p. 104-15.
45. Ventura, A., et al., *Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters*. Cell, 2008. **132**(5): p. 875-86.

46. Mendell, J.T. and E.N. Olson, *MicroRNAs in stress signaling and human disease*. Cell, 2012. **148**(6): p. 1172-87.
47. Leung, A.K. and P.A. Sharp, *MicroRNA functions in stress responses*. Mol Cell, 2010. **40**(2): p. 205-15.
48. Saito, Y. and H. Saito, *MicroRNAs in cancers and neurodegenerative disorders*. Front Genet, 2012. **3**: p. 194.
49. Garzon, R., G.A. Calin, and C.M. Croce, *MicroRNAs in Cancer*. Annu Rev Med, 2009. **60**: p. 167-79.
50. Lujambio, A. and S.W. Lowe, *The microcosmos of cancer*. Nature, 2012. **482**(7385): p. 347-55.
51. Broderick, J.A. and P.D. Zamore, *MicroRNA therapeutics*. Gene Ther, 2011. **18**(12): p. 1104-10.
52. Lopez-Otin, C., et al., *The hallmarks of aging*. Cell, 2013. **153**(6): p. 1194-217.
53. Pendas, A.M., et al., *Defective prelamin A processing and muscular and adipocyte alterations in Zmpste24 metalloproteinase-deficient mice*. Nat Genet, 2002. **31**(1): p. 94-9.
54. Varela, I., et al., *Accelerated ageing in mice deficient in Zmpste24 protease is linked to p53 signalling activation*. Nature, 2005. **437**(7058): p. 564-8.
55. Marino, G., et al., *Insulin-like growth factor 1 treatment extends longevity in a mouse model of human premature aging by restoring somatotroph axis function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(37): p. 16268-73.
56. Ugalde, A.P., et al., *Aging and chronic DNA damage response activate a regulatory pathway involving miR-29 and p53*. EMBO J, 2011. **30**(11): p. 2219-32.
57. Kriegel, A.J., et al., *The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury*. Physiol Genomics, 2012. **44**(4): p. 237-44.
58. Vettori, S., S. Gay, and O. Distler, *Role of MicroRNAs in Fibrosis*. Open Rheumatol J, 2012. **6**: p. 130-9.
59. Roderburg, C., et al., *Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis*. Hepatology, 2011. **53**(1): p. 209-18.
60. Qin, W., et al., *TGF-beta/Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29*. J Am Soc Nephrol, 2011. **22**(8): p. 1462-74.
61. Maurer, B., et al., *MicroRNA-29, a key regulator of collagen expression in systemic sclerosis*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(6): p. 1733-43.
62. van Rooij, E., et al., *Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(35): p. 13027-32.
63. Maegdefessel, L., et al., *Inhibition of microRNA-29b reduces murine abdominal aortic aneurysm development*. J Clin Invest, 2012. **122**(2): p. 497-506.
64. Cushing, L., et al., *miR-29 is a major regulator of genes associated with pulmonary fibrosis*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011. **45**(2): p. 287-94.
65. Xiao, J., et al., *miR-29 inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice*. Mol Ther, 2012. **20**(6): p. 1251-60.
66. Ashcroft, T., J.M. Simpson, and V. Timbrell, *Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale*. J Clin Pathol, 1988. **41**(4): p. 467-70.
67. Albaiceta, G.M., et al., *Absence or inhibition of matrix metalloproteinase-8 decreases ventilator-induced lung injury*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010. **43**(5): p. 555-63.
68. Smith, K.M., et al., *miR-29ab1 deficiency identifies a negative feedback loop controlling Th1 bias that is dysregulated in multiple sclerosis*. J Immunol, 2012. **189**(4): p. 1567-76.
69. Umezawa, H., et al., *Studies on bleomycin*. Cancer, 1967. **20**(5): p. 891-5.
70. Chen, J. and J. Stubbe, *Bleomycins: towards better therapeutics*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(2): p. 102-12.
71. Muggia, F.M., A.C. Louie, and B.I. Sikic, *Pulmonary toxicity of antitumor agents*. Cancer Treat Rev, 1983. **10**(4): p. 221-43.

72. Janick-Buckner, D., G.E. Ranges, and M.P. Hacker, *Alteration of bronchoalveolar lavage cell populations following bleomycin treatment in mice*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1989. **100**(3): p. 465-73.
73. Schrier, D.J., R.G. Kunkel, and S.H. Phan, *The role of strain variation in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis*. *Am Rev Respir Dis*, 1983. **127**(1): p. 63-6.
74. Luna, C., et al., *Cross-talk between miR-29 and transforming growth factor-betas in trabecular meshwork cells*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011. **52**(6): p. 3567-72.
75. Wang, G., et al., *Urinary miR-21, miR-29, and miR-93: novel biomarkers of fibrosis*. *Am J Nephrol*, 2012. **36**(5): p. 412-8.
76. Lv, L.L., et al., *MicroRNA-29c in urinary exosome/microvesicle as a biomarker of renal fibrosis*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013. **305**(8): p. F1220-7.
77. Roncarati, R., et al., *Circulating miR-29a, among other up-regulated microRNAs, is the only biomarker for both hypertrophy and fibrosis in patients with hypertrophic cardiomyopathy*. *J Am Coll Cardiol*, 2014. **63**(9): p. 920-7.
78. Liu, A. and X. Xu, *MicroRNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues*. *Methods Mol Biol*, 2011. **724**: p. 259-67.