



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO SISTEMAS BIOLÓGICOS
LICENCIATURA EN QFB

REGISTRO DEL SERVICIO SOCIAL

**Determinación del Efecto de Pentostatina como
inhibidor de las Proteínas Adenosin Desaminasas en Los
microRNAs Relacionados con la Inducción de un Fenotipo
Profibrosante en Fibroblastos Pulmonares**

QUE PRESENTA EL ALUMNO (A)

Susana Sánchez Ruiz

Matrícula

2142035123

ASESOR EXTERNO

Dr. Víctor Manuel Ruiz López
Jefe de laboratorio de Biología Molecular
Del INER.

ASESOR INTERNO

DRA. ANA LAURA ESQUIVEL CAMPOS
Departamento de Sistemas Biológicos
No. Eco. 33148

México, CDMX a 17 de junio de 2019

ÍNDICE

pág.

Contenido

Introducción.....	3
Marco Teórico.....	3
Fibrosis pulmonar idiopática	3
El papel de los microRNAs en la fibrosis pulmonar idiopática	4
MiR-21 en fibrosis pulmonar idiopática	5
Let-7d	6
miR-155	6
Edición de los microRNAs por las proteínas Deaminasas de Adenosina	6
Inhibidores de ADAR (pentostatina)	9
Objetivos	10
General:.....	10
Específicos:	10
Justificación.....	12
METODOLOGÍA	12
Materiales y Métodos	12
Cultivo celular	12
Estimulación con el inhibidor de pentostatina	12
Extracción de RNA total.....	12
Síntesis de cDNA y retrotranscripción.....	13
PCR en tiempo real.....	14
Análisis estadístico.....	14
Análisis de resultados.....	26
Conclusión.....	31
Resumen.....	33
Fuentes de Información.....	34

Introducción

Marco Teórico

Fibrosis pulmonar idiopática

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es un prototipo de enfermedad pulmonar crónica, progresiva y mortal. Está caracterizada por una alteración de la arquitectura pulmonar, principalmente intersticial, en donde se van acumulando proteínas de la matriz extracelular, lo que conduce a una disminución de la función pulmonar, y en última instancia, insuficiencia respiratoria y la muerte (Lederer & Martínez, 2018). En la actualidad, la fibrosis pulmonar idiopática generalmente se considera una consecuencia de múltiples factores de riesgo genéticos y ambientales que interactúan, con micro lesiones locales repetitivas en el epitelio alveolar que juega un papel central. Estas micro-lesiones inician una comunicación aberrante de las células del epitelio alveolar con los fibroblastos localizados en la matriz intersticial, la inducción de miofibroblastos productores de matriz y una considerable acumulación de la matriz extracelular y la remodelación del intersticio pulmonar (Hopkins, Burke, Fell, Dion, & Kolb, 2016). La incidencia de fibrosis pulmonar idiopática ha aumentado con el tiempo, y en Europa y América del Norte se estima que oscila entre 2, 8 y 18 casos por 100, 000 personas por año. Se dispone de pocos datos para la variación mundial, pero la incidencia podría ser menor en Asia y América del Sur, donde se estima que oscila entre 4 y 5 casos por 100, 000 personas por año (Hutchinson, Fogarty, Hubbard, & McKeever, 2015). La fibrosis pulmonar idiopática es más común en hombres de 65 años y es rara en personas menores de 50 años. Aunque el curso de la enfermedad es variable e impredecible, el tiempo medio de supervivencia es de 2 a 4 años (Ley, Collard, & King, 2011).

Los fibroblastos son el tipo celular más abundante en los tejidos conjuntivos no cartilaginosos, participan activamente en la producción y remodelación de la matriz extracelular, se encargan principalmente de la síntesis de colágena, esencialmente de los tipos I y III, fibras elásticas, proteoglicanos, fibronectina y otras glicoproteínas. Los miofibroblastos son una subpoblación de fibroblastos que participan en la embriogénesis, organogénesis, inflamación, reparación y cicatrización, teniendo una participación fundamental en los procesos de regeneración y reparación (fibrosis) que ocurren en los diferentes órganos. La diferenciación de los miofibroblastos está influenciada por citocinas y factores de crecimiento secretados por las células locales, así como por células inflamatorias, la composición de la matriz extracelular y la rigidez de la misma. El TGFβ1 es

un mediador importante de la fibrosis pulmonar idiopática y puede inducir la activación y diferenciación de fibroblastos/miofibroblastos (Milosevic, J., Pandit et.al., 2012).

Los mecanismos moleculares de la transformación de una matriz extracelular normal a una alterada, en la fibrosis pulmonar idiopática es poco conocida, la evidencia sugiere que el depósito de la matriz extracelular alterada contribuye a la patogénesis de la enfermedad. Las alteraciones cambian el comportamiento celular, y un circuito de retroalimentación positiva entre los fibroblastos y la matriz extracelular aberrante promueve la fibrosis (Lederer & Martínez, 2018).

El papel de los microRNAs en la fibrosis pulmonar idiopática

Los microRNAs, pequeñas moléculas de RNA que desempeñan un papel fundamental en diversos procesos fisiológicos como; la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis, han surgido como reguladores clave de los fenotipos de órganos y posibles blancos terapéuticos en múltiples enfermedades, como la fibrosis pulmonar idiopática (Pandit, Milosevic, & Kaminski, 2011).

Los microRNAs son un tipo de RNA cortos de alrededor de 19-22 nt que suprimen la expresión de proteínas mediante el emparejamiento de bases con la región 3' UTR de los mRNA diana, induciendo de manera específica su silenciamiento o su degradación (Bushati & Cohen, 2007).

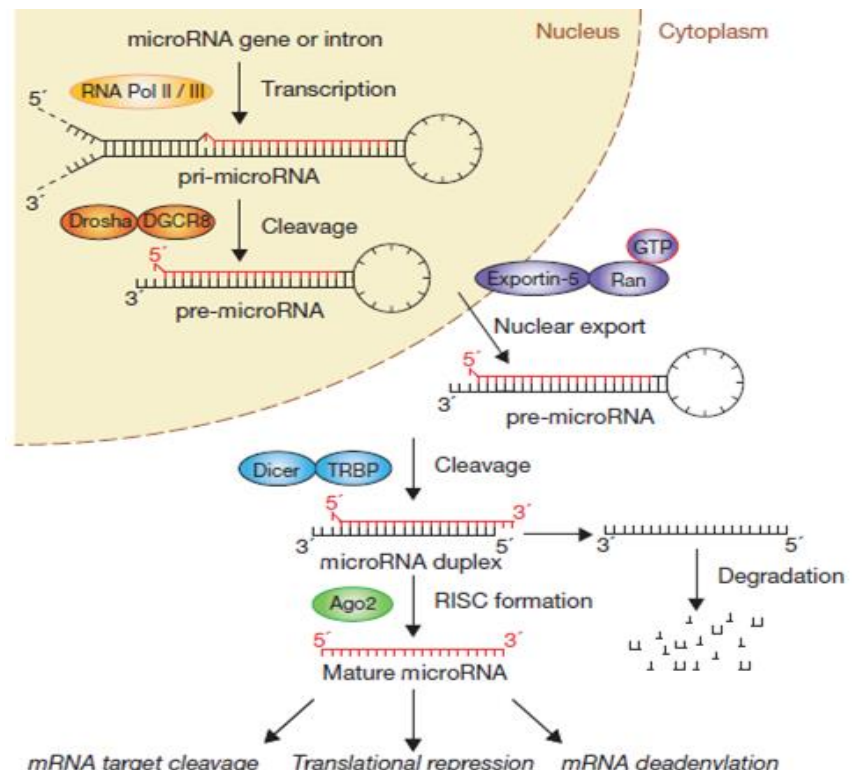


Figura 1. La ruta canónica "lineal" del procesamiento de microRNA. Los microRNA funcionan como reguladores post-transcripcionales de la expresión génica, se transcriben por la ARN polimerasa II o III como transcritos primarios (pri-miARN) y se someten a la escisión por el complejo microprocesador Drosha – DGCR8 en el núcleo; para formar el precursor de microARN (pre-miARN). Este pre-miRNA se exporta desde el núcleo al citoplasma por Exportin-5 – Ran-GTP. En el citoplasma, el RNase Dicer en complejo con la proteína de unión a ARN de doble cadena TRBP corta la horquilla de pre-miRNA a su longitud madura. La cadena funcional del miRNA maduro se carga junto con las proteínas (Ago2) en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), donde guía a RISC a silenciar los mRNAs a través de la escisión del mRNA, la represión de la traducción o la degradación, mientras que la cadena en color negro es degradada. (Pandit & Milosevic, 2015).

Los microRNA funcionan como reguladores post-transcripcionales de la expresión génica, se transcriben por la RNA polimerasa II o III como transcritos primarios (pri-miRNA) y se someten a la escisión por el complejo microprocesador Drosha – DGCR8 en el núcleo; para formar el precursor de microRNA (pre-miRNA). Este pre-miRNA se exporta desde el núcleo al citoplasma por Exportin-5 – Ran-GTP. En el citoplasma, el RNase Dicer en complejo con la proteína de unión a RNA de doble cadena TRBP corta la horquilla de pre-miRNA a su longitud madura. La cadena funcional del miRNA maduro se carga junto con las proteínas Argonaute (Ago2) en el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC), donde guía a RISC a silenciar los mRNAs a través de la escisión del mRNA, la represión de la traducción o la degradación, mientras que la cadena en color negro se degrada. (Pandit & Milosevic, 2015) (figura 1).

Estudios de expresión de microRNA identificaron un cambio significativo en el 10% de microRNAs entre el control y los pulmones IPF (Milosevic et al., 2012). La lesión epitelial inicia una cascada de eventos que incluyen la regulación positiva de los microRNA profibróticos y la regulación negativa de los microRNA antifibróticos. Sus acciones posteriores producen la activación de los fibroblastos residentes y la diferenciación de los miofibroblastos. Esto resulta en la proliferación y migración de los fibroblastos, la cicatrización aberrante de las heridas y la acumulación excesiva de la matriz extracelular (Vuga et al., 2009). Entre los microRNAs diferencialmente expresados en FPI se encuentran miRNA-21, Let-7d y miR-155.

MiR-21 en fibrosis pulmonar idiopática

MiR-21 está regulado positivamente en IPF y uno de sus blancos es SMAD7, un inhibidor de la señalización de TGF- β (Liu et al., 2010). TGF- β 1 es la citocina pro-fibrogénica más importante que aumenta la expresión de miR-21 en los fibroblastos de pulmón. Por lo tanto, miR-21 provoca la activación de la ruta del TGF- β 1 y, en última instancia, promueve la aparición y el desarrollo de la IPF al inhibir a *Smad7*. En conjunto, TGF- β 1 promueve la IPF mediante la regulación de un bucle de realimentación miR-21 / *Smad7*. miR-21 aumenta significativamente en los pulmones de los ratones tratados con bleomicina y en los pulmones humanos de pacientes con FPI (Liu et al., 2010), donde se localiza en los focos fibroblásticos (Li, Zhao, Shan, & Liang, 2014).

Let-7d

Por el contrario, Let-7d es un microRNA con actividad antifibrosante que se encuentra disminuido en tejido y cultivos celulares de pacientes con FPI. Se ha asociado a la disminución de este microRNA con el incremento en el depósito de colágena y el engrosamiento de los septos alveolares y se ha demostrado que la inhibición de Let-7d da como resultado el desarrollo de un fenotipo profibrosante (Díaz-Piña Gabriela, 2018). La familia humana de let-7 incluye 12 miembros (let-7-a1, -a2, -a3, -b, -c, -d, -e, -f1, -f2, -g, -i y miR-98). De acuerdo con un estudio (Li, Zhao, Shan, & Liang, 2016) se demostró que la inhibición específica de let-7d en el tejido pulmonar del ratón induce la transición epitelial-mesenquimatosa (EMT), lo que aumenta el grosor de las paredes alveolares y eventualmente causa fibrosis pulmonar.

miR-155

Mientras han mostrado un aumento de la expresión de miR-155 después del tratamiento con TNF- α e IL-1 β , así como una expresión reducida después del tratamiento con TGF β 1 en fibroblastos de pulmón humano. Los estudios funcionales demostraron que el factor de crecimiento de queratinocitos (FGF-7) es un objetivo directo de miR-155 y que la transfección de miR-155 en fibroblastos causó la migración de éstos (Pandit et al., 2011).

Edición de los microRNAs por las proteínas Deaminasas de Adenosina

La edición de RNA es uno de los mecanismos postranscripcionales para introducir cambios en las secuencias de RNA codificadas por el genoma. En el reino animal el tipo de edición más común al RNA es el cambio de un nucleótido por otro mediado por las desaminasas de adenosina (ADAR) que actúan sobre el RNA (Yang, W., et al., 2006). La edición de RNA consiste en una conversión enzimática de adenosina para producir inosina específica en el pre-mRNA (figura 2. a), estas inosinas son reconocidas como guanosinas por la maquinaria de traducción, esta edición da lugar a la formación de estructuras secundarias de doble cadena (dsRNA) imperfectas, lo que lleva a la alteración de las propiedades tanto del RNA como de la proteína traducida (Yang L. et al., 2012).

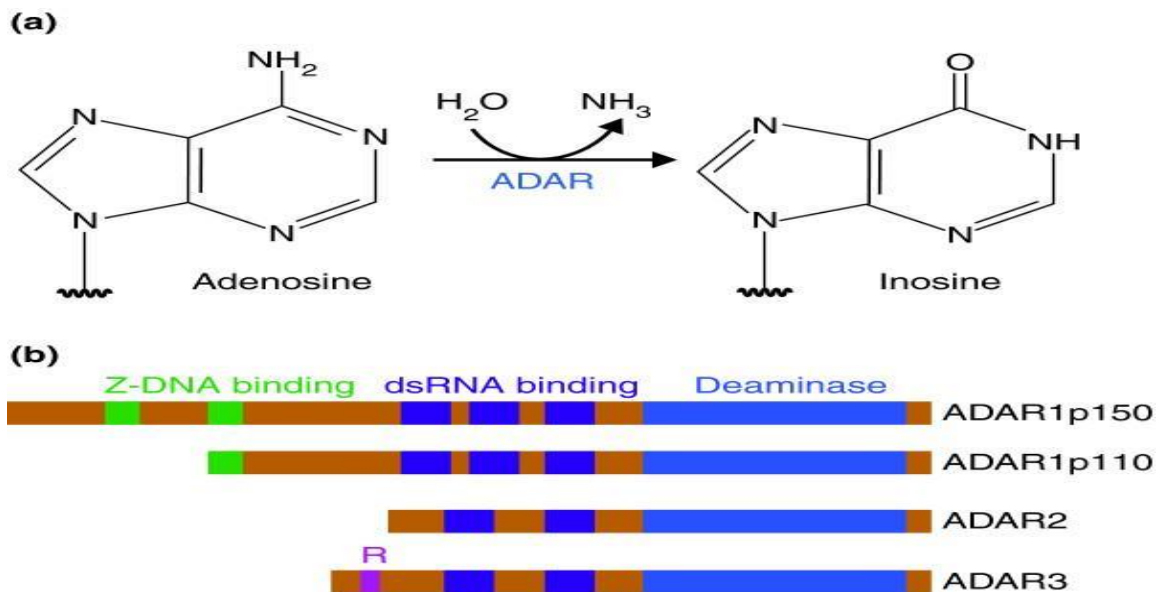


Figura 2. La desaminación de adenosina y la familia de enzimas ADAR. (a) Las enzimas ADAR catalizan la reacción de desaminación hidrolítica, mediante la cual una adenosina pierde un grupo amino y se convierte en inosina. (b) Hay cuatro proteínas principales de la familia de enzimas ADAR: dos isoformas de ADAR1 (p110 y p150), ADAR2 y ADAR3. Todas estas enzimas contienen un dominio de desaminasa conservado, que se muestra en azul. Los dominios de unión a RNA de doble cadena (ds), que se muestran en púrpura, determinan la especificidad del sustrato. Las dos isoformas ADAR1 difieren en sus dominios de unión a Z-ADN, que se muestran en verde. ADAR3 contiene un dominio rico en arginina, que se muestra en rosa, que se une al RNA monocatenario, (Slotkin, William and Nishikura, Kazuko. 2013).

En mamíferos, dos miembros de la adenosina desaminasa, ADAR1 y ADAR2, son enzimáticamente activos para catalizar la reacción de desaminación (figura 1 b). ADAR 3 contiene un dominio rico en arginina, que se une al RNA monocatenario. Estas proteínas están altamente conservadas en los vertebrados. ADAR1 se expresa tanto en la isoforma p110 constitutiva como en la isoforma p150 inducible por interferón. ADAR1 y ADAR2 están presentes en muchos tejidos, mientras que ADAR3 se expresa específicamente en tejidos cerebrales y se cree que es catalíticamente inactivo. Las proteínas ADAR contienen un dominio de desaminasa conservado que media en la edición A a I, así como dominios de unión a RNA de doble cadena variables que son necesarios para la especificidad y la unión del sustrato (Figura 1 b). La homodimerización de ADAR es necesaria para las actividades de edición, como se observa in vitro y se confirma con estudios in vivo (Cho et al., 2003). Una sola subunidad ADAR mutada afecta la función del dímero de manera negativa dominante, lo que sugiere un grado de cooperatividad entre las subunidades de ADAR. Las proteínas ADAR pueden editar tanto

el RNA de doble cadena codificante como el no codificante y pueden actuar de una manera específica o no específica del sitio (Slotkin & Nishikura, 2013).

La evidencia reciente muestra que las desaminasas de adenosina que actúan sobre el RNA (ADAR) pueden editar los microRNA (Orlandi, Barbon, & Barlati, 2012). Recientemente se ha descubierto que la edición de los pri-microRNAs y los pre-microRNAs regula el procesamiento de los microRNAs y puede dar como resultado la supresión del procesamiento mediado por Drosha y Dicer, como consecuencia los niveles de microRNAs maduros disminuyen. Además, la edición de un miRNA puede afectar las interacciones de

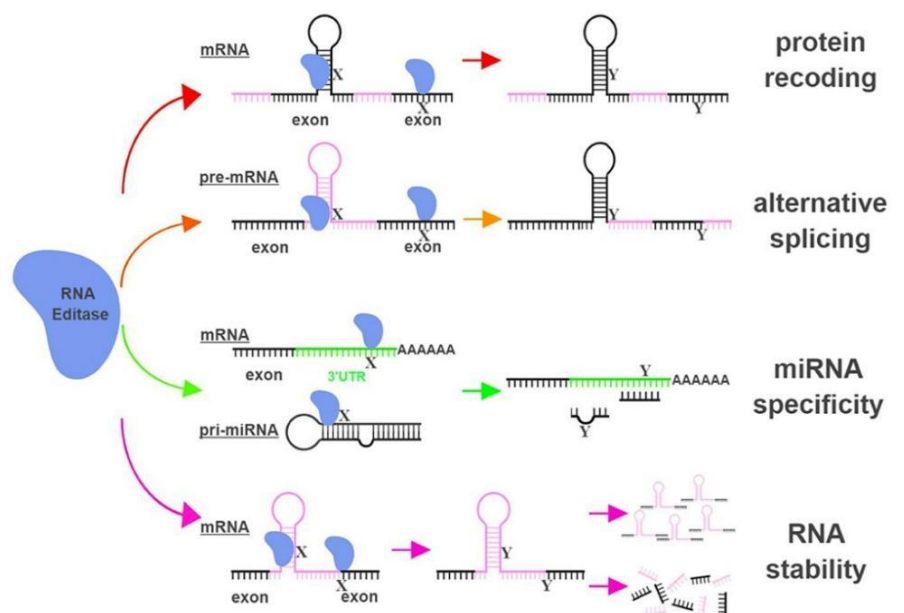


Figura 3. La edición de ARN conduce a consecuencias funcionales a través de múltiples mecanismos. Las adenosin desaminasas de ARN (ADAR1, ADAR2, ADAR3) regulan sus dianas a través de múltiples mecanismos, incluida la alteración de secuencias de ARNm en los exones para cambiar las secuencias de aminoácidos (recodificación de proteínas; flechas rojas), cambiando los patrones de empalme del pre-ARNm para crear nuevos productos (empalme alternativo; flechas naranjas), que influyen en la especificidad de miARN al alterar las secuencias de semillas de miARN o secuencias de sitios de direccionamiento de miARN (especificidad de miARN; flechas verdes), y que afectan directamente la estabilidad de los ARN editados (estabilidad del ARN; flechas magenta). X representa una base de ARN dirigida para adenosin desaminasas de ARN (adenosina para ADAR), e Y representa la base de ARN resultante después de la edición (inosina para ADAR). La estructura de la horquilla en el ARNm representa elementos de repetición de Alu a los que frecuentemente se dirigen las ADAR de ARN. UTR, región no traducida. La figura fue creada con BioRender. (Nishikura, 2013)

emparejamiento de bases y puede redirigir el miRNA, cambiando en última instancia la secuencia del mRNA objetivo (Nishikura, 2013). Algunos miRNAs se procesan de manera más eficiente cuando son editados por ADAR. En otros casos, el pri-miRNA es procesado por el complejo Drosha/DGCR8 y da lugar a nuevas isoformas mientras que en otros casos la edición no permite que el premiRNA sea reconocido y exportado al citoplasma (W. Yang et al., 2006). varios pri-microRNAs y pre-microRNAs están sujetos a edición mediada por ADAR y esto puede inhibir procesamiento y la producción de microRNAs maduros, afectando la unión de los microRNAs al complejo de RISC, o redirigiéndolo a un nuevo grupo de mRNAs blanco (Díaz-Piña Gabriela, 20018).

El impacto funcional de la edición de RNA en la biología celular se demuestra a través de (1) cambios en las secuencias de aminoácidos de las proteínas (recodificación); (2) alteración de los patrones de empalme del pre-mRNA; (3) causando cambios en las secuencias de semillas de microRNA (miRNA) o en secuencias de sitios de direccionamiento de miRNA; y (4) influir en la estabilidad de los RNA blancos (Kung, Maggi, & Weber, 2018). (Figura 3).

Inhibidores de ADAR (pentostatina)

Se necesitan inhibidores de la edición de RNA capaces de bloquear la desaminación en adenosinas específicas. Tales moléculas serán herramientas de investigación valiosas para estudiar las consecuencias de la edición en sitios específicos. Además, los inhibidores de la edición selectiva del sitio podrían tener un potencial terapéutico, ya que la hiperedición en sitios específicos se correlaciona con ciertos estados de enfermedad (Mizrahi, Schirle, & Beal, 2013). Los inhibidores de la edición de RNA específicos del sitio, necesitan una alta afinidad y selectividad para sus RNA objetivo y ser capaces de bloquear la actividad de las proteínas ADAR de unión fuerte. También deben ser no tóxicos, capaces de penetrar en el núcleo celular y permitir la traducción del RNA maduro (Schirle, Goodman, Krishnamurthy, & Beal, 2010).

La participación de las proteínas Deaminasas de Adenosina en diversos trastornos de salud provocó numerosos intentos de desarrollar inhibidores de la ADAR como un agente terapéutico potencial. Varios compuestos naturales y sintéticos no relacionados estructuralmente con diversos grados de potencia han sido reportados como inhibidores de Deaminasas de adenosina (Kandalkar et al., 2017). Entre ellos, la 2'-desoxicoformicina o pentostatina, clorhidrato de adenina eritro-9- (2-hidroxi-3-nonil) (EHNA) y 2,3 Dideoxiadenosina son inhibidores de ADAR en estado de transición que ocurren naturalmente con afinidad pico-molar. EHNA se une fuertemente en el sitio activo de ADAR por varios enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrófobas (Kandalkar et al., 2017). La coformicina y la 2'-desoxicoformicina son los inhibidores más potentes de ADAR. Dichos inhibidores pueden ser útiles en estudios diseñados para proporcionar una comprensión del papel fisiológico de ADAR tanto en el estado normal como en enfermedades como en la fibrosis pulmonar idiopática. Es por ello que en esta investigación se determinó el efecto de la pentostatina como inhibidor de ADAR1 y ADAR2 y el efecto que tenía la maduración de los microRNAs relacionados con la inducción de un fenotipo profibrosante en fibroblastos pulmonares fibróticos.

Objetivos

General:

- Determinar el efecto de Pentostatina, como inhibidor de las proteínas adenosin desaminasas en la maduración de los microRNAs relacionados con la inducción de un fenotipo pro fibrosante en fibroblastos pulmonares fibróticos.

Específicos:

- Hacer curvas de dosis respuesta de Pentostatina, en una línea celular de fibroblastos pulmonares fibróticos para determinar la expresión de moléculas pro-fibrosantes.
- Determinar el efecto de Pentostatina a diferentes concentraciones y tiempos, en la expresión de los microRNAs miR-21, miR-155 y Let7d en una línea de fibroblastos pulmonares fibróticos.
- Determinar el efecto de Pentostatina, en la expresión genes profibrosantes TGFB1, colágena alfa tipo I, colágena alfa tipo III en una línea celular de fibroblastos pulmonares fibróticos.

Justificación

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una patología caracterizada por fibrosis pulmonar progresiva e irreversible de etiología desconocida, su incidencia y prevalencia en el mundo es muy variable y ha aumentado con el tiempo, en Europa y América del Norte se estima que oscila entre 2, 8 y 18 casos por 100, 000 personas por año (Hutchinson, Fogarty, Hubbard, & McKeever, 2015). En México no se cuenta con datos epidemiológicos representativos, sin embargo, en promedio cada neumólogo de México diagnóstica 8 pacientes con FPI por año, este mismo patrón de presentación se conserva en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), la FPI es una de las tres causas más comunes de morbilidad y mortalidad de Enfermedad Pulmonar Intersticial (Mejía, Mayra. et.al.2016). Por otro lado, La FPI es una enfermedad de difícil diagnóstico y con frecuencia requiere la colaboración de un grupo de médicos expertos en enfermedades pulmonares intersticiales; (neumólogo, radiólogo y patólogo) para alcanzar un diagnóstico en consenso a través de una discusión multidisciplinaria (Mejía, Mayra et.al.,2016). Con respecto al abordaje terapéutico, éste sigue siendo un reto, ya que al igual que para el diagnóstico se requiere un manejo sistemático que incluya tratamiento de comorbilidades, oxigenoterapia, rehabilitación pulmonar y en el último año, el tratamiento farmacológico con moléculas antifibróticas como nintedanib y/o pirfenidona (Longo, Dan L, MD; Lederer, David, MD; & Martínez, Fernando J, MD. 2018). En la actualidad, con el uso de técnicas moleculares se ha podido entender el mecanismo molecular de la fibrosis pulmonar idiopática y la participación de los microRNAs en la patogénesis de la enfermedad (Jiang, X. et.al.2010), de la misma manera, se ha demostrado la participación de las proteínas adenosin desaminasas en la edición de estos microRNAs (Roberts, J. T. et.al., 2018).

Con base en lo anterior, los avances en la investigación de esta patología en México permitirán un mejor abordaje diagnóstico/ terapéutico en enfermedades intersticiales del pulmón (Barreto-Rodríguez et.al., 2015), es por ello, que en esta investigación se pretende determinar el efecto de la pentostatina como inhibidor de ADAR y el efecto que tenga la maduración de los microRNAs relacionados con la inducción de un fenotipo profibrosante en fibroblastos pulmonares fibróticos. Tales moléculas serán herramientas de investigación valiosas para estudiar las consecuencias de la edición en sitios específicos, Además, los inhibidores podrían tener un potencial terapéutico, ya que la hiperedición en sitios específicos se correlaciona con ciertos estados de enfermedad (Wulff BE., Nishikura K. 2011).

METODOLOGÍA

Materiales y Métodos

Cultivo celular

Se utilizó una línea celular de fibroblastos pulmonares fibróticos HIPF-286, la cual se sembró en cajas de cultivo de 175 cm² en medio Ham F-12 (Gibco), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Las células se incubaron a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%, hasta alcanzar una confluencia del 80%.

Estimulación con el inhibidor de pentostatina

Una vez alcanzada la confluencia del 80 %, se procedió a retirar el sobrenadante de los medios, se agregó PBS para lavar las células mismo que se retiró, para posteriormente agregar 4 mL de tripsina, se incubó a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5% durante 1 minuto; Se añadió medio de cultivo hasta obtener un volumen final de 22 mL.

Para obtener una suspensión de células individuales, la biomasa se recogió en un tubo falcon de 50 mL, se centrifugó durante 10 minutos a 1800 rpm , enseguida se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de medio, se tomaron 10 µL de la suspensión celular en 90 µL de azul tripano y se llevó a cabo el conteo celular en una cámara de Neubauer, se ajustó la concentración celular con una cantidad de 130,000 células por pozo en placas de 12 pozos en 1 mL de medio Ham F-12 (Gibco), suplementado con 10% de (SFB) suero fetal bovino, las células se incubaron durante 24 horas a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%.

Después de las 24 horas de incubación, se procedió a estimular a los fibroblastos con el inhibidor de ADAR; pentostatina (Santa Cruz Biotechnology) en concentraciones que van desde 10⁻⁷ , 10⁻⁸ ,10⁻⁹ , y 10⁻¹⁰ M. Se retiró el medio de cultivo y se lavó dos veces con PBS, posteriormente se agregaron las diferentes concentraciones del inhibidor en medio Ham F-12 (Gibco), suplementado con 0.1 % de suero fetal bovino (SFB) a 37°C con 5% CO₂; a diferentes horas de inhibición 3, 6, 12 ,18 y 24 horas. Para luego llevar a cabo la extracción del RNA total con Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Extracción de RNA total

Las muestras de cada tiempo fueron tratadas con 1 mL de Trizol (TRI Reagent®), el cual se dejó incubar durante 5 minutos para tener acceso al material genético, a cada tubo con trizol se agregaron 200 µL de cloroformo y se incubaron durante 3 minutos a temperatura ambiente, posteriormente, se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recuperó la fase acuosa

y a esta se le agregó 1 µL de Glucógeno a cada muestra. Se adicionaron 500 µL de isopropanol a cada muestra y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y se lavó el botón con 1 mL de etanol al 80% y se centrifugó a 7500 rpm durante 5 minutos a 4 °C, se decantó el sobrenadante y se dejaron secar las muestras sobre papel absorbente por aproximadamente 10 minutos. El RNA se resuspendió en 14 µL de agua libre de RNAsas. El RNA se cuantificó utilizando un espectrofotómetro UV (Spectrophotometer NanoDrop ND-1000) a una absorbancia de 260 nm. La pureza del RNA se determinó con las relaciones 260/280 y 260/230.

Síntesis de cDNA y retrotranscripción

El RNA obtenido se utilizó para sintetizar cDNA. Para eliminar el DNA genómico contaminante se añadió 200 ng de RNA total, el cual fue tratado con 1 µL de DNAsa y 1 µL de buffer de DNAsa (Fermentas) para un volumen total de 10 µL, en el termociclador durante 30 minutos a 37°C, posteriormente se le agregó 1 µL de EDTA 25 mM y se incubó por 10 minutos a 65°C. La síntesis de cDNA se realizó por transcripción reversa. El cDNA se sintetizó utilizando el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription de Applied Biosystems de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A la mezcla anterior tratada con DNAsa, fue mezclada con una con una solución que consiste en: 2 µL 10X RT Buffer, 0.8 µL de 25X dNTP Mix (100 mM), 2 µL de 10X RT Random Primers, 1.2 µL de agua libre de RNAsas, 1 µL de inhibidor de RNAsa y 1 µL de la enzima Transcriptasa Reversa. Con las siguientes condiciones: dos ciclos de 37°C durante 60 minutos. Posteriormente el cDNA se utilizó para cuantificar por PCR en tiempo real los niveles de expresión de las moléculas TGFB1, COL I y COL III. Como control endógeno se utilizó Polr2A.

Para cuantificar los niveles de expresión de los microRNAs se utilizó el RNA total, se eliminó 100 ng de RNA el cual fue tratado con 1 µL de DNAsa y 1 µL de buffer de DNAsa (Fermentas) para un volumen total de 10 µL, en el termociclador durante 30 minutos a 37°C, posteriormente se le agregó 1 µL de EDTA 25 mM y se incubó por 10 minutos a 65°C. El RNA se cuantificó utilizando un espectrofotómetro UV (Spectrophotometer NanoDrop ND-1000) a una absorbancia de 260 nm. Posteriormente se tomaron 10 ng de de RNA para la reacción de transcripción reversa (TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit, applied biosystems), que consistía en: 0.15 µL 25X dNTP Mix (100 mM), 1 µL la enzima Transcriptasa Reversa, 1.5 µL de 10X RT Buffer, 0.19 µL de inhibidor de RNAsa, 2 µL de 5X RT primer y 5.16 µL de agua libre de RNAsas para un volumen final de 15 µL. El

cDNA obtenido fue utilizado para determinar los niveles de expresión de miR-21, Let-7d y miR-155 en la línea fibrótica HIPF-286 y el grupo control; los datos fueron normalizados con U48.

PCR en tiempo real

El cDNA sintetizado se utilizó para la PCR en tiempo real, utilizando el sistema QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un volumen de 15 μL , el cual contenía: 4.8 μL de cDNA, 7.2 μL de Master Mix (TaqMan Universal PCR Master, Thermo Fisher), 0.13 μL de sonda u oligo y se llevó a un volumen final de 15 μL con agua libre de nucleasas. Se amplificaron los productos de miR-21, Let-7d y miR-155 utilizando sondas (Applied Biosystems) u oligos específicos para cada mensajero. Como genes endógenos se utilizaron PolR2A (para mRNA) y U48 (para microRNAs). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: $\frac{50.0^{\circ}\text{C}}{02.00 \text{ minutos}}$

$\frac{95^{\circ}\text{C}}{10.00 \text{ minutos}}$ / $\frac{95.0^{\circ}\text{C}}{00.15 \text{ segundos}}$ / $\frac{60.0^{\circ}\text{C}}{01.00 \text{ minutos}}$.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con la prueba (ANOVA), Prueba de Tukey, comparaciones de todos los grupos y prueba de Dunnett; comparación del grupo control respecto las cuatro concentraciones de Pentostatina en los diferentes tiempos, para comparar los niveles de expresión, los resultados se expresarán como la media \pm SD, todos los análisis estadísticos se llevarán a cabo utilizando el programa estadístico inerSTAT-a v1.3 del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), México.

RESULTADOS

Niveles de expresión de moléculas pro-fibrosantes, TGFB1, colágena de los tipos I y III en una línea celular fibrótica HIPF-286

El análisis de la expresión génica de moléculas pro-fibrosantes, con el estímulo de 3 horas del inhibidor de ADAR (pentostatina), los genes de TGFB1 y colágena tipo I no muestran diferencia significativas en ninguna concentración respecto al control (Fig. 1A y 1B), sin embargo, la expresión de colágena tipo III muestra un aumento significativo en la expresión con el estímulo a una concentración de 10^{-10} M del inhibidor; (* $p= -3.07378$, Figura 1C) en fibroblastos pulmonares HIPF-286 con un valor de (* $p<0.05$).

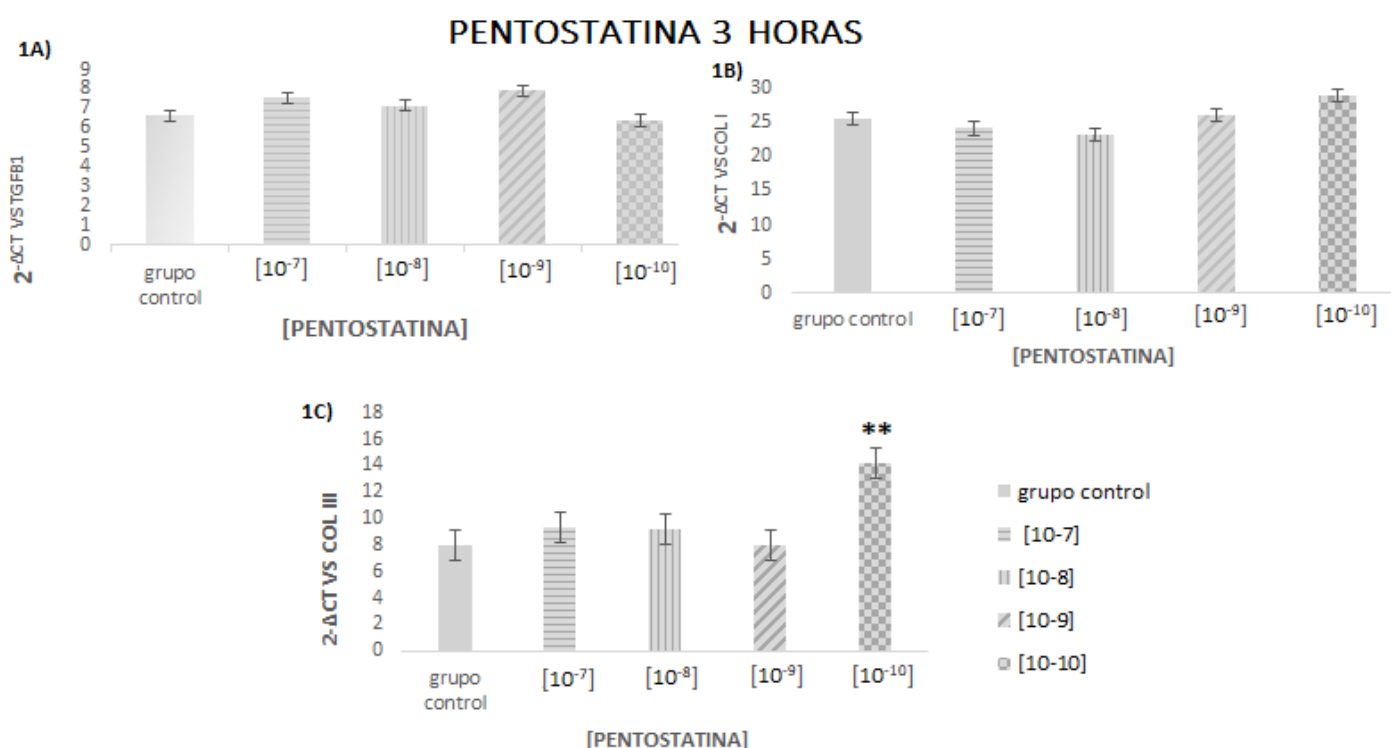


Figura 1. Determinación de la expresión génica de TGFB1, Colágena de los tipos I y III, en fibroblastos pulmonares fibróticos, HIPF-286; estimulación de 3 hrs con pentostatina a diferentes concentraciones. 1A) y 1B) TGFB1 y COL I no muestran diferencia significativa. 1C) la expresión de colágena tipo III muestra un aumento significativo en la expresión con el estímulo a una concentración de 10^{-10} M de pentostatina; (* $p= -3.07378$).

Por otro lado, con el estímulo de 6 hrs de pentostatina, tanto los genes de expresión de TGFB1, como los de colágena tipo I y III en fibroblastos pulmonares fibróticos HIPF-286, no muestran diferencias significativas en la expresión en ninguna de las concentraciones del inhibidor, respecto al control.

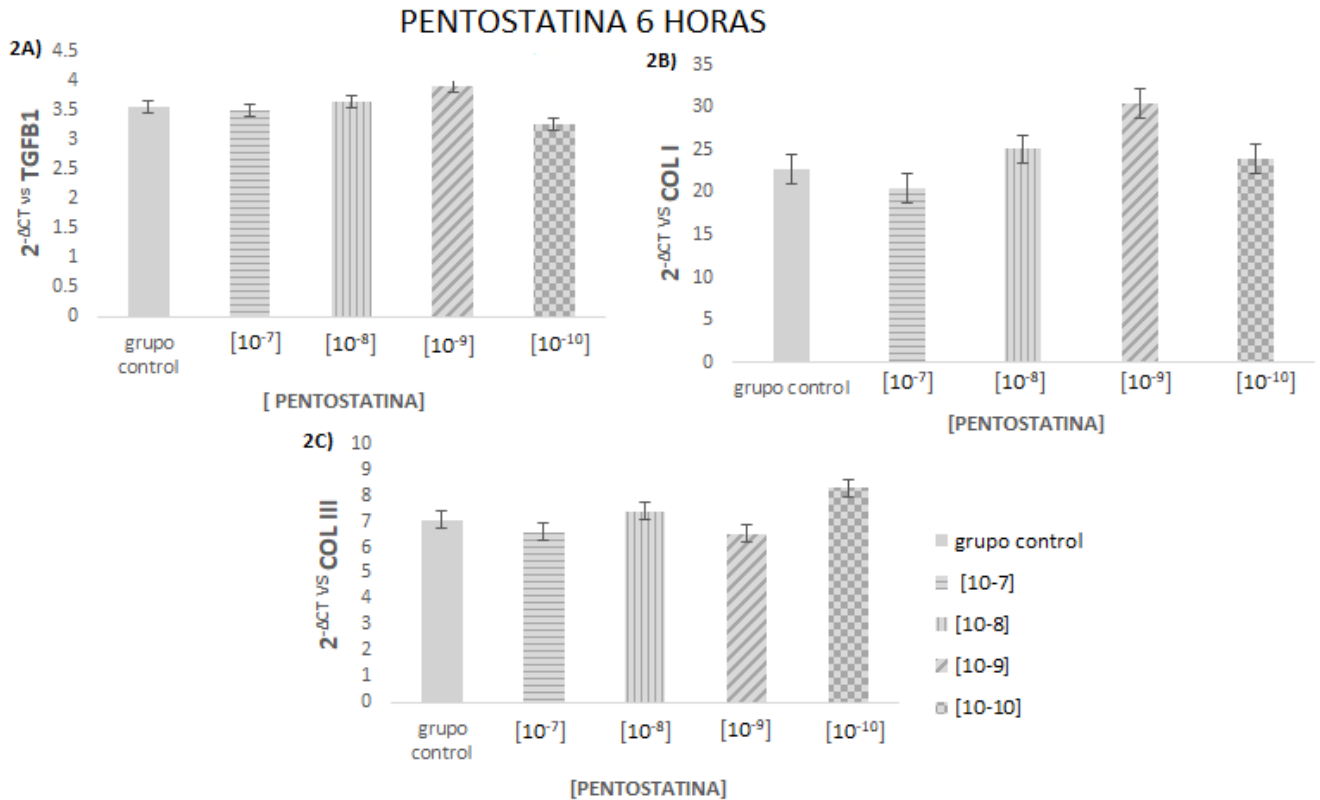


Figura 2. Determinación de la expresión génica de TGFB1, Colágena de los tipos I y III, en fibroblastos pulmonares fibróticos, HIPF-286; estimulación de 6 hrs con pentostatina a diferentes concentraciones. Los genes de expresión de TGFB1, y colágena tipo I y III no muestran diferencia significativa en ninguna de las concentraciones del inhibidor, en el tiempo de 6 hrs.

La estimulación de 12 hrs con pentostatina en los fibroblastos pulmonares fibróticos HIPF-286, para la expresión en los genes de TGFB1 y colágena tipo I no muestran diferencias significativas en ninguna de las concentraciones, respecto al control. En cambio, para la expresión de colágena tipo III, al llevar a cabo la comparación de todos los grupos y la comparación respecto al control, existe una disminución significativa en la expresión con el estímulo a 12 hrs en la concentración de 10⁻¹⁰ M de pentostatina con un valor de (*p<0.05, Figura 3C) y de (*p<0.01) en comparación al grupo control.

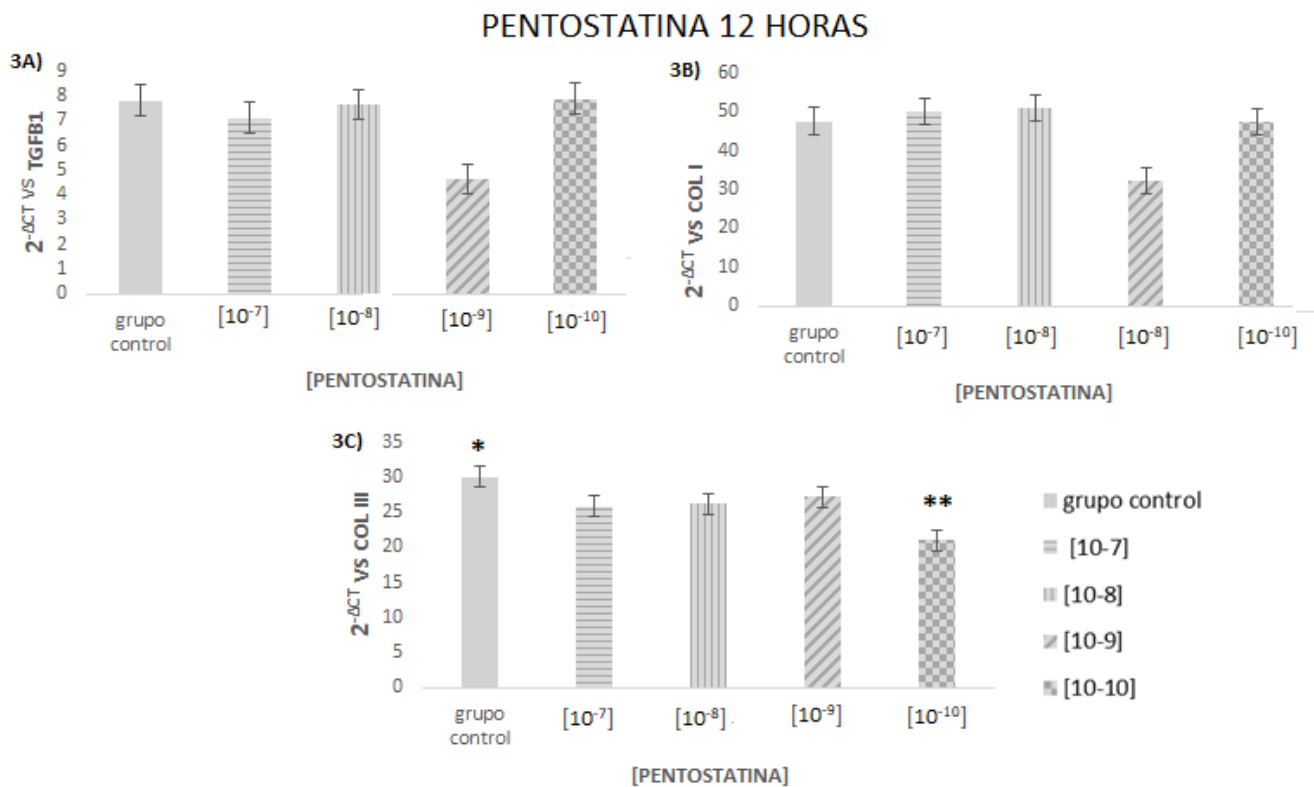


Figura 3. Determinación de la expresión génica de TGFB1, Colágena de los tipos I y III, en fibroblastos pulmonares fibróticos, HIPF-286; estimulación de 12 hrs con pentostatina a diferentes concentraciones. los genes de TGFB1 y colágena tipo I no muestran diferencias significativas en ninguna de las concentraciones, respecto al control, Para colágena tipo II existe una disminución de la expresión, en la concentración 10⁻¹⁰ M de pentostatina con un valor de (**p<0.05, Figura 3C) y de (*p<0.01) en comparación al grupo control.

Respecto a la estimulación de 18 hrs con el inhibidor de pentostatina para la expresión de TGFB1; no muestra diferencias significativas, respecto al control en ninguna de las concentraciones (figura, 4A). Sin embargo, para la expresión de colágena del tipo I; se observa una disminución significativa de la expresión al llevar cabo el análisis de todos los grupos y cada uno de ellos respecto al control, para las concentraciones que van desde 10⁻⁷ a 10⁻⁹ M de pentostatina, con valor de (*p<0.01, Figura 4B). Por otro lado, para la expresión de colágena tipo III se muestra una disminución significativa de

las concentraciones que van desde 10^{-7} a 10^{-10} M de pentostatina al llevar a cabo el análisis de todos los grupos y cada uno de ellos respecto al control con un valor de ($*p < 0.01$, Figura 4C).

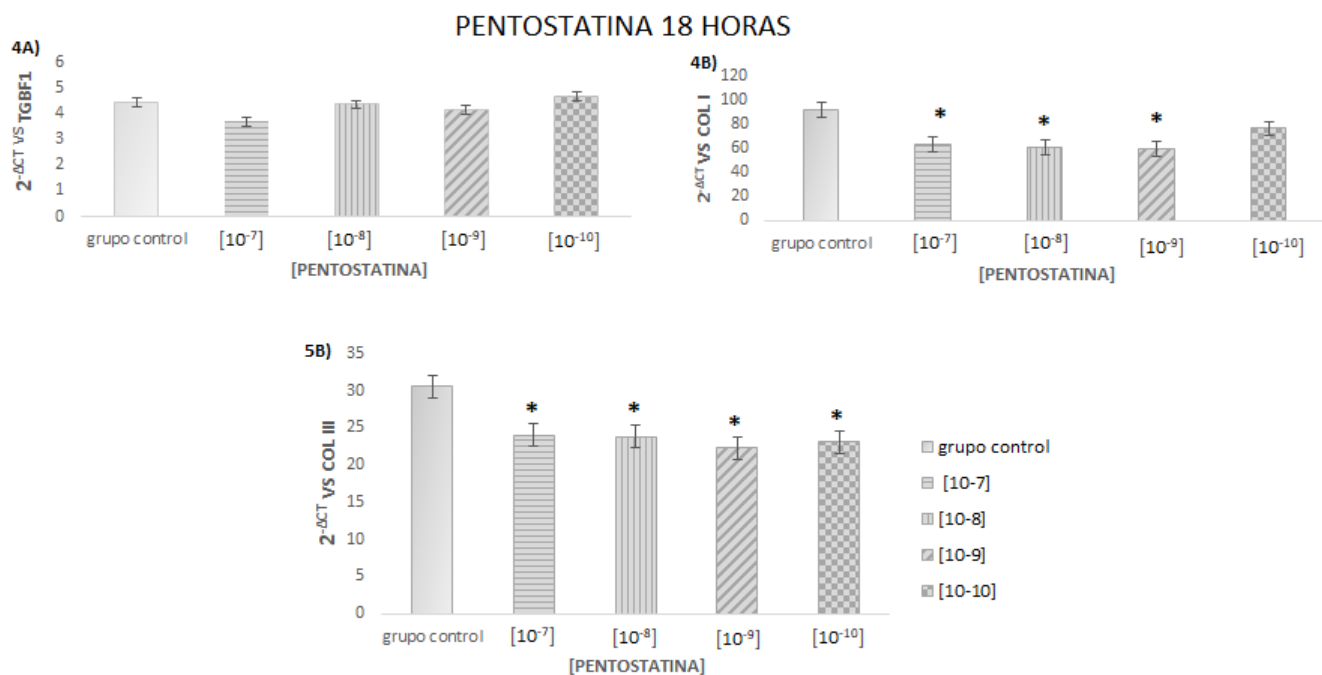


Figura 4. Determinación de la expresión génica de TGFβ1, Colágena de los tipos I y III, en fibroblastos pulmonares fibróticos, HIPF-286; estimulación de 18 hrs con pentostatina a diferentes concentraciones. TGFβ1 no existe diferencia significativa en la expresión del gen. Para la expresión de colágena de los tipos I y III; existe una disminución significativa, en las concentraciones que van desde 10^{-7} a 10^{-9} para la expresión de Col I y de 10^{-7} a 10^{-10} para colágena tipo III, ambas con valores de ($*p < 0.01$).

En cuanto a la expresión con la estimulación de 24 hrs con el inhibidor de pentostatina para el gen de TGFβ1, se observa una disminución significativa de la expresión, al llevar a cabo el análisis y la comparación de todos los grupos, y la comparación de cada grupo respecto al control, con un valor de ($*p < 0.01$) para las concentraciones que van desde 10^{-7} a 10^{-10} M de pentostatina. En cambio, para la expresión de colágena de los tipos I y III a pesar de que existe una disminución, en la expresión, esta no es significativa en ninguna de las concentraciones, en comparación al grupo control.

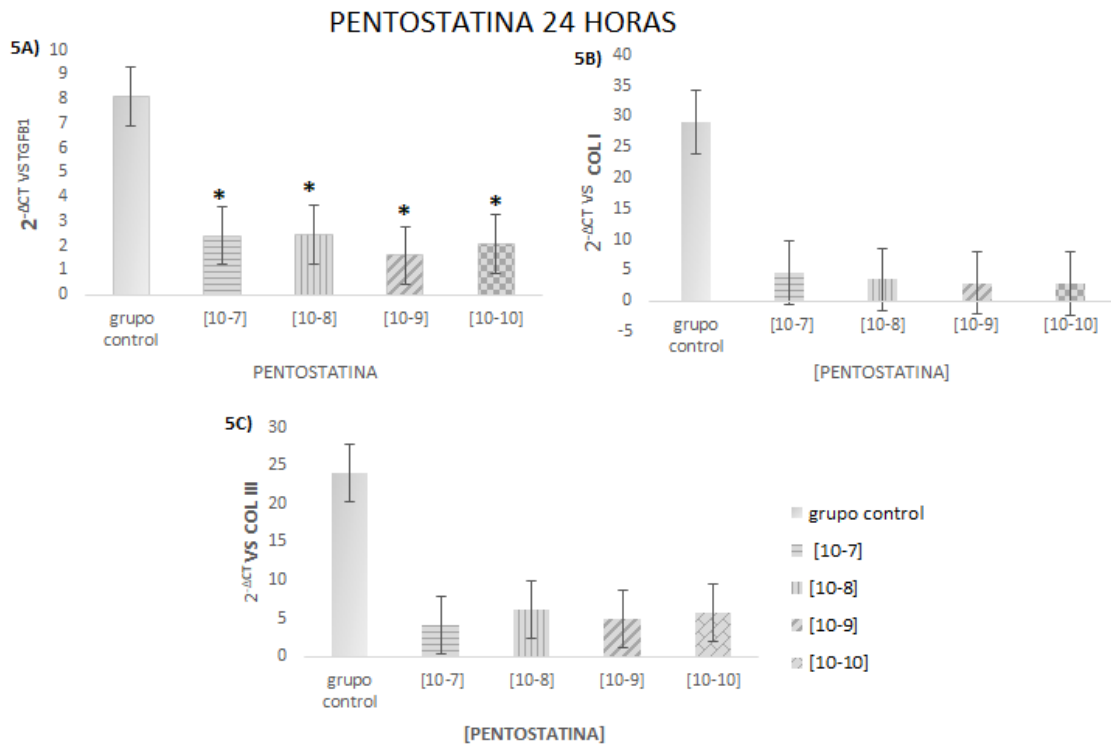


Figura 5. Determinación de la expresión génica de TGFβ1, Colágena de los tipos I y III, en fibroblastos pulmonares fibróticos, HIPF-286; estimulación de 24 hrs con pentostatina a diferentes concentraciones. P ara el gen de TGFβ1, existe una disminución significativa en la expresión, al llevar a cabo la comparación de todos los grupos y la comparación de cada grupo, respecto al control con un valor de (*p<0.01) para las concentraciones que van desde 10⁻⁷ a 10⁻¹⁰ M de pentostatina. Para la expresión de colágena de los tipos I y III no hay diferencias significativas.

Niveles de expresión de microRNAs mir-21, mir-155 y let-7d en fibroblastos pulmonares fibróticos, línea celular HIPF-286.

Al llevar a cabo el análisis de la expresión génica de los microRNAs, relacionados con un fenotipo pro-fibrosante en la fibrosis pulmonar idiopática, podemos observar que, con la estimulación de pentostatina, la expresión del miRNA-21 a las 3, 6, 12 y 24 hrs no muestran diferencias significativas, sin embargo, conforme aumenta el tiempo de inhibición existe una disminución de la expresión de mir-21, e igual se observa que para ninguna concentración del inhibidor exista un cambio significativo (figura 6, A,B,C y F). Por otro lado, para el estímulo de 18 hrs con el inhibidor , al llevar a cabo la comparación de todos los grupos, existe una disminución significativa en la expresión de este microRNA , en las concentraciones que van desde 10⁻⁷ a 10⁻⁹ M de pentostatina respecto a la concentración de 10⁻¹⁰ M del inhibidor con un valor de (**p<0.05,)), en cambio al hacer el análisis de

cada grupo se observa un aumento en la expresión de este microRNA con la concentración de 10^{-10} M de pentostatina respecto al control con un valor de (** $p < 0.05$).

Para la determinación de la expresión del miR-155, con el hinhibidor de pentostatina en los

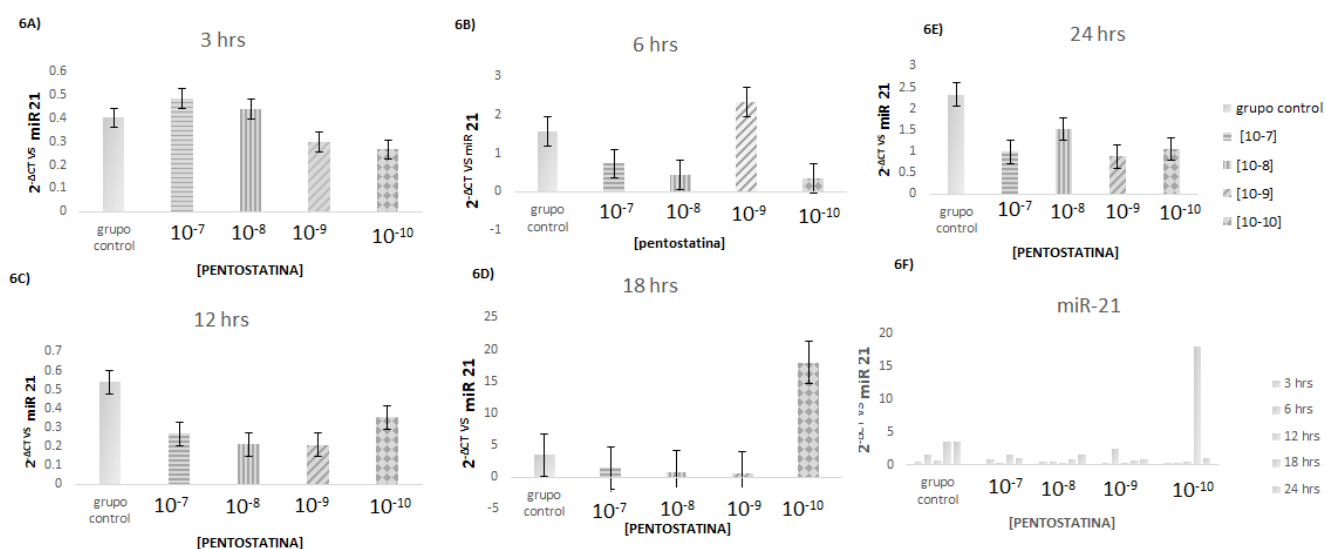


Figura 6. Determinación de la expresión génica de miRNA-21, en fibroblastos pulmonares fibróticos HIPF-286; estimulación de 3, 6, 12, 18 y 24 hrs a concentraciones que van desde 10^{-7} a 10^{-10} M de pentostatina. A, B, C, D y F) para la expresión del miRNA-21 con los estímulos de 3, 6, 12 y 24 hrs no muestran diferencias significativas, sin embargo, conforme aumenta el tiempo de inhibición existe una disminución de la expresión de mir-21.

diferentes tiempos de estimulación y las diferentes concentraciones del inhibidor se puede observar, que en los tiempos de 3, 6 y 18 hrs no muestran diferencias significativas en la expresión del miR-155, en la comparación de todos los grupos, así como, cada uno de los grupos respecto al control, en cada una de las concentraciones. Sin embargo, para la estimulación de 12 hrs con el inhibidor, se muestra una disminución significativa de la expresión de este microRNA en las concentraciones que van desde 10^{-7} a 10^{-9} M de pentostatina en comparación con la concentración de 10^{-10} M (* $p = 0.005976$, figura 7C) en fibroblastos pulmonares HIPF-286 con un valor de (** $p < 0.05$) en las concentraciones de 10^{-7} y 10^{-9} y un valor de (* $p < 0.01$) para las concentraciones de 10^{-8} y 10^{-10}

M del inhibidor , así mismo muestra un aumento en la expresión respecto al control con un valor de (* $p < 0.01$) en la concentración de 10^{-10} M del inhibidor en fibroblastos pulmonares HIPF-286.

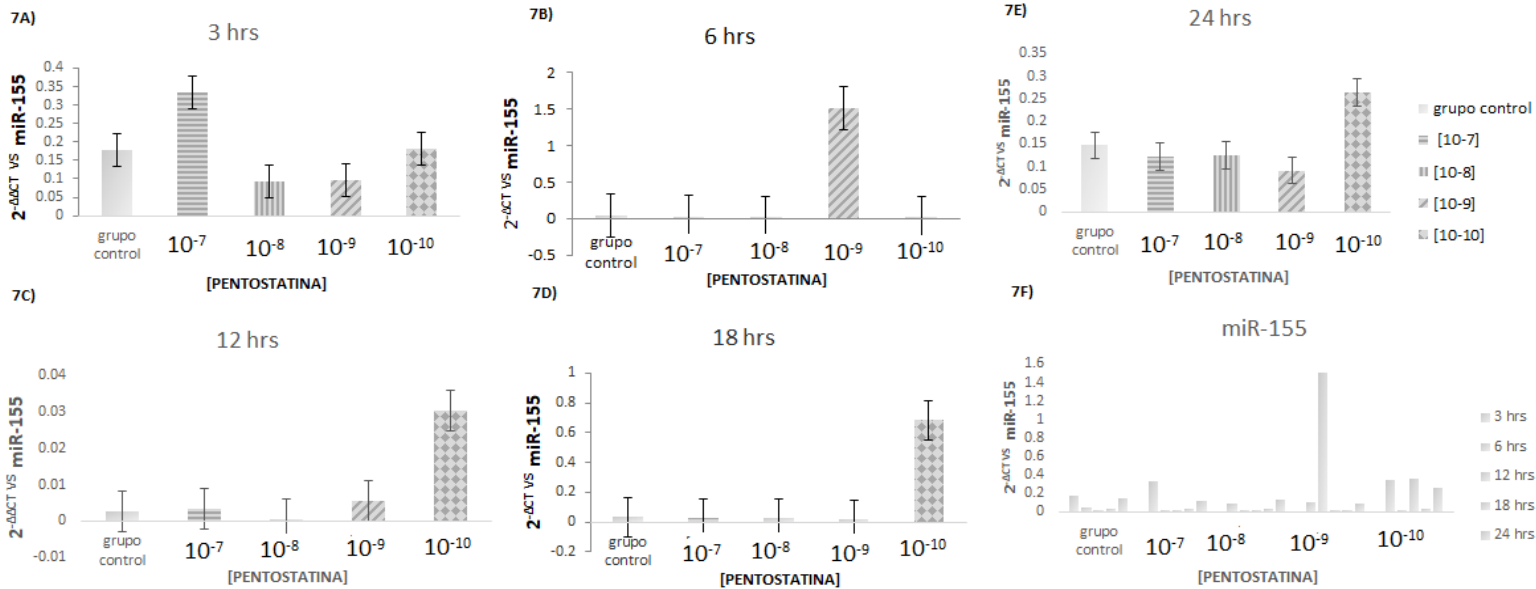


Figura 7. Determinación de la expresión génica de miRNA-155, en fibroblastos pulmonares fibróticos HIPF-286; estimulación de 3, 6, 12, 18 y 24 hrs a concentraciones que van desde 10^{-7} a 10^{-10} M de pentostatina. Los tiempos de 3, 6 y 18 hrs no muestran diferencias significativas en la expresión del miR-155. Para la estimulación de 12 hrs con el inhibidor, se muestra una disminución significativa de la expresión de este microRNA en las concentraciones que van desde 10^{-7} a 10^{-9} M de pentostatina en comparación con la concentración de 10^{-10} M (* $p=0.005976$). Muestra un aumento en la expresión respecto al control con un valor de (* $p < 0.01$) en la concentración de 10^{-10} M del inhibidor en fibroblastos pulmonares HIPF-286.

En cuanto a la expresión de miR-let-7d con los estímulos 6, 18 y 24 hrs con el inhibidor de pentostatina en las diferentes concentraciones, no muestra un cambio significativo en la expresión de este microRNA (figura 8 B, D y E), en la comparación de todos los grupos, así como, cada uno de los grupos respecto al control. En cambio para la estimulación con 3 hrs del inhibidor, al llevar a cabo la comparación de todos los grupos; se observa un aumento de la expresión de miR-let-7d en la concentración del inhibidor de 10^{-7} M en comparación con la concentración de 10^{-9} M en donde (* $p=0.038666$, figura 8A) en fibroblastos pulmonares HIPF-286 con un valor de (** $p < 0.05$), sin embargo, no existe diferencia, respecto al control. Por otro lado, para el estímulo de 12 hrs se observa un aumento significativo en la expresión de este microRNA, al llevar a cabo la comparación de cada uno de los grupos, respecto al control, en la concentración de 10^{-10} M del inhibidor

(*p=0.037623, figura 8C) en fibroblastos pulmonares HIPF-286 con un valor de (**p<0.05), respecto al control.

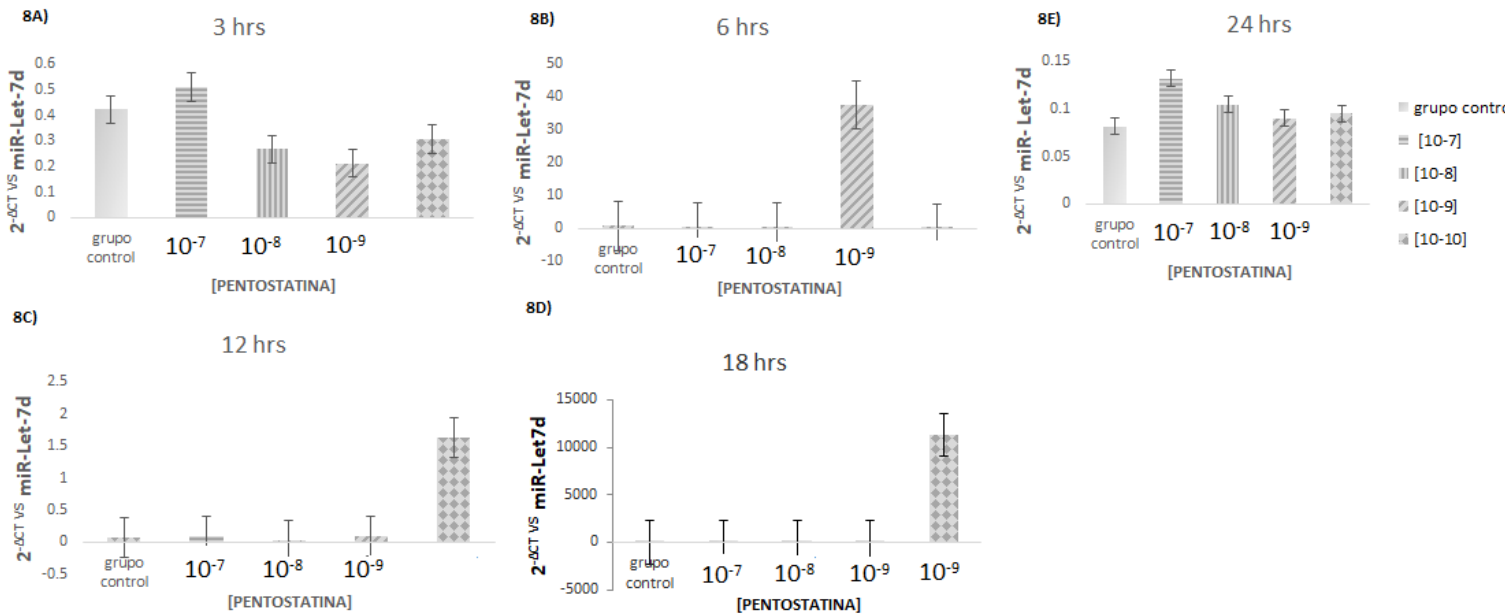


Figura 8. Determinación de la expresión génica de miRNA-Let-7d, en fibroblastos pulmonares fibróticos HIPF-286; estimulación de 3, 6, 12, 18 y 24 hrs a concentraciones que van desde 10^{-7} a 10^{-10} M de pentostatina. los estímulos 6, 18 y 24 hrs con el inhibidor de pentostatina en las diferentes concentraciones, no muestra un cambio significativo en la expresión de este microRNA. la estimulación con 3 hrs del inhibidor se observa un aumento de la expresión de miR-let-7d en la concentración del inhibidor de 10^{-7} M en comparación con la concentración de 10^{-9} M en donde (*p=0.038666). el estímulo de 12 hrs se observa un aumento significativo en la expresión de este microRNA en la concentración de 10^{-10} M del inhibidor (*p=0.037623).

Comparación de todos los tiempos de cada expresión de moléculas pro-fibrosantes, TGFB1, colágena de los tipos I y III para cada concentración en una línea celular fibrótica HIPF-286

Al llevar a cabo el análisis de la expresión Génica de TGFB1 con todos los tiempos de inhibición y las diferentes concentraciones, se puede observar que del tiempo de 3 a las 6 horas de inhibición con pentostatina al llevar a cabo la comparación de todos los grupos respecto al control, existe una disminución en la expresión de cada una de las concentraciones utilizadas, posteriormente al llevar a cabo el análisis de todos los grupos, de las 6 a las 12 horas de inhibición, existe un aumento de la expresión para las concentraciones de 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-10} M, por otro lado, existe una disminución en la expresión para la concentración de 10^{-8} M la cual no es significativa y después de las 18 a las 24 horas para la concentración de 10^{-10} M existe una disminución significativa de la expresión con un valor de (*p<0.01, Figura 9, respecto al control).

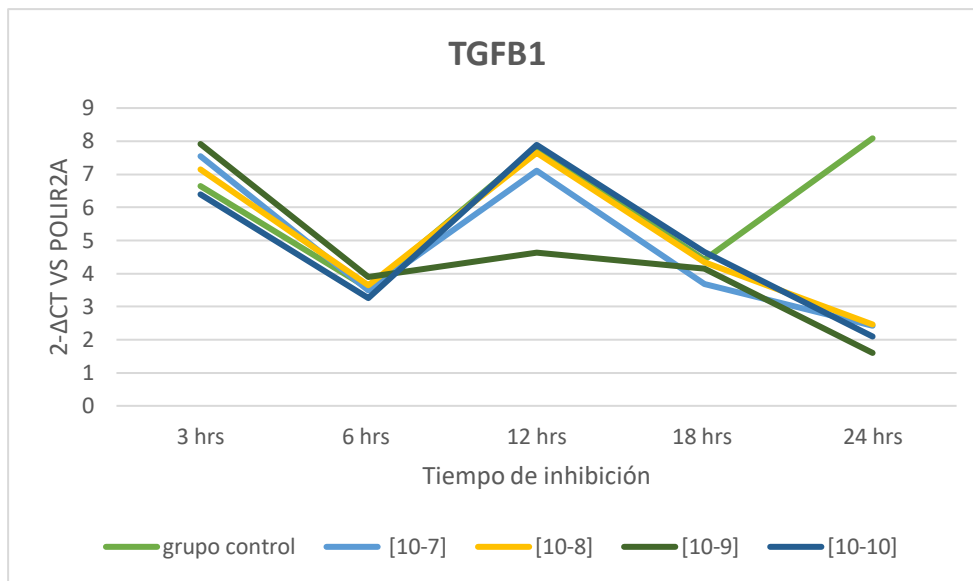


Figura 9. Comparación de la molécula pro-fibrosante TGFB1 para cada tiempo y concentración con pentostatina. Se observa una disminución de la expresión de las 3 a las 6 Horas para cada concentración incluyendo grupo control, existe un aumento de la expresión de las 6 a las 12 horas de inhibición con pentostatina para cada concentración a excepción de la concentración de 10^{-8} y por último una disminución de la expresión de las 12 a las 24 horas de inhibición, a excepción del grupo control en donde se observa un aumento de la expresión.

Para la molécula pro-fibrosante colágena tipo III, se puede observar que la expresión en el tiempo de inhibición de 3 a 6 horas, la expresión se mantiene igual para cada concentración, por otro lado,

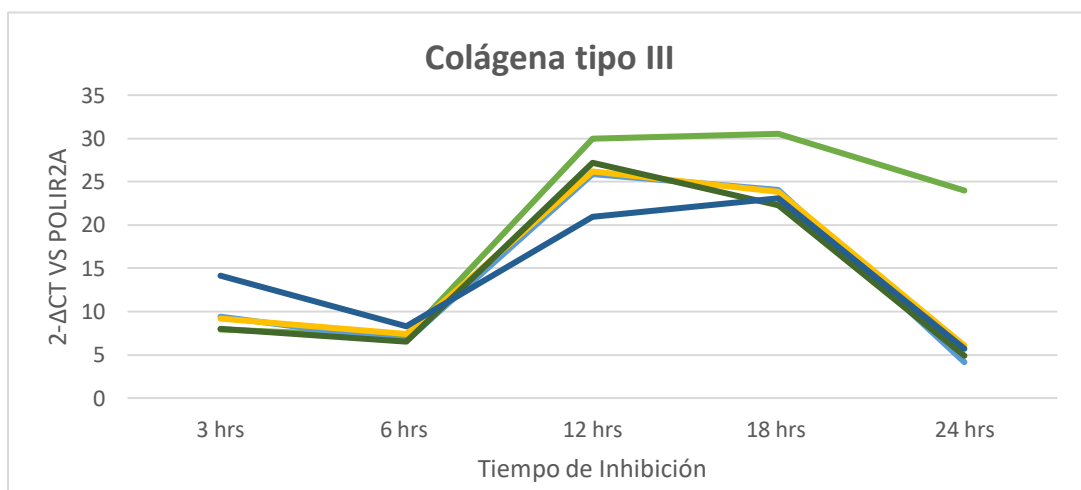


Figura 10. Comparación de la molécula pro-fibrosante Colágeno tipo III para cada tiempo y concentración con pentostatina. Se puede observar que la expresión en el tiempo de inhibición de 3 a 6 horas, la expresión se mantiene igual para cada concentración, de 6 a 12 horas la expresión aumenta, de 12 a 18 horas la expresión se mantiene y de 18 a 24 horas la expresión disminuye.

de las 6 a las 12 horas existe un aumento de la expresión, y para el tiempo de inhibición de 12 a 18 horas la expresión se mantiene para cada concentración, por último, de las 18 a las 24 horas existe una disminución de la expresión de esta molécula para cada concentración utilizada del inhibidor de pentostatina (Figura. 10). Para la expresión de colágeno de tipo II al llevar a cabo la comparación de todos los tiempos para cada concentración de pentostatina, se puede observar que la expresión a las 3 horas se mantiene para cada concentración, a partir de las 6 a las 18 horas existe un aumento de la expresión en todas las concentraciones sin que estas sean mayores que el grupo control, y de las 18 a las 24 horas existe una disminución de la expresión para colágeno del tipo II.

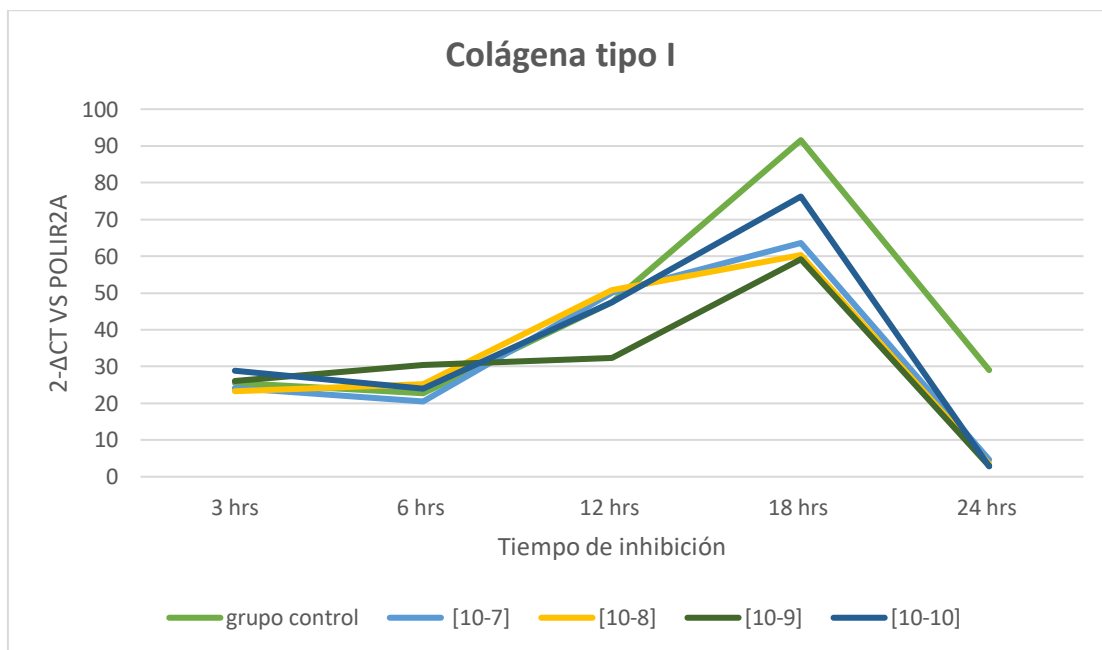


Figura 11. Comparación de la molécula pro-fibrosante Colágeno tipo III para cada tiempo y concentración con pentostatina. Se puede observar que la expresión a las 3 horas se mantiene para cada concentración, a partir de las 6 a las 18 horas existe un aumento de la expresión y de las 18 a las 24 horas una disminución para cada concentración

Para el análisis de la expresión de los microRNAs al llevar a cabo la comparación de todos los tiempos para cada concentración de pentostatina, se puede observar que para los microRNAs miR-21 y miR-let 7d (figura 12 A y B) la expresión de 3 a 24 horas se mantiene constante para las concentraciones que van de 10^{-7} a 10^{-9} M y el grupo control, sin embargo, existe un aumento de la expresión para ambos microRNAs en el tiempo de inhibición de 18 horas y en la concentración de 10^{-10} M de pentostatina, posteriormente se observa una disminución de la expresión a las 24 horas para la concentración de 10^{-10} M.

Por otro lado, para la expresión de miR- 155 (figura. 12 C) al comparar todos los tiempos para cada concentración de pentostatina, se observa que la expresión de miR-155 para las concentraciones 10^{-7} y 10^{-8} M se mantiene constante de las 3 a las 24 horas de inhibición y para la concentración de 10^{-9} M existe un aumento de la expresión en el tiempo de inhibición de 6 horas que posteriormente disminuye de las 12 a las 24 horas. Para la concentración de 10^{-10} M de pentostatina, existe un aumento de la expresión a las 18 horas de inhibición para la expresión de miR-155, que disminuye a las 24 horas.

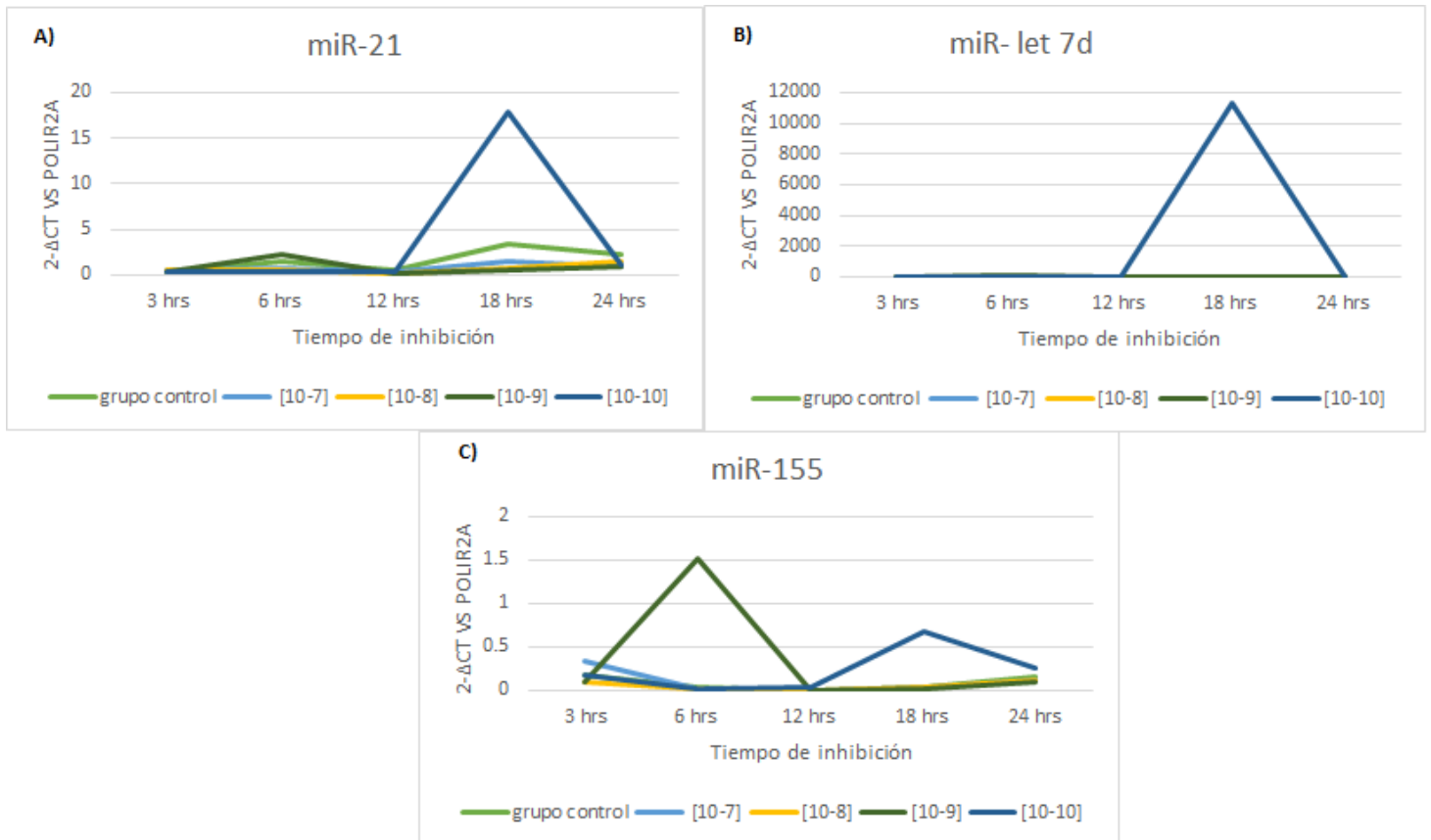


Figura 12. Comparación de la expresión de los microRNAs para cada tiempo y concentración con pentostatina. A y B) MicroRNAs miR-21 y miR-let 7d la expresión de 3 a 24 horas se mantiene constante para las concentraciones que van de 10^{-7} a 10^{-8} M y el grupo control, existe un aumento de la expresión para ambos microRNAs en el tiempo de inhibición de 18 horas y en la concentración de 10^{-10} M de pentostatina. C) La expresión de miR- 155 para las concentraciones 10^{-7} y 10^{-8} M se mantiene constante de las 3 a las 24 horas de inhibición y para la concentración de 10^{-9} M existe un aumento de la expresión en el tiempo de inhibición de 6 horas. Para la concentración de 10^{-10} M de pentostatina, existe un aumento de la expresión a las 18 horas de inhibición para la expresión de miR-155.

Análisis de resultados

Las desaminasas de adenosina afectan la expresión de RNAs, se ha descrito que estas enzimas pueden regular el procesamiento y la actividad de los microRNAs a diferentes niveles (Díaz-Piña et.al, 2018), juegan un papel importante en diferentes funciones fisiológicas, tanto en estado normal, así como en diferentes patologías como el cáncer (Roberts, J. T. et.al.2018). El uso de los inhibidores de ADAR pueden ser útiles en estudios diseñados para proporcionar una comprensión del papel fisiológico de las proteínas desaminasas de adenosina (Mizrahi, R. A., Schirle, N. T., & Beal, P. A. 2013), es por ello que, y de acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación; se destaca el papel que tiene el uso de pentostatina como inhibidor de ADAR tras la estimulación a diferentes concentraciones y diferentes tiempos en una línea celular de fibroblastos pulmonares fibróticos HIPF-286, además de la expresión de moléculas pro-fibrosantes como TGFB1, colágena del tipo I y III involucradas en la progresión de la fibrosis pulmonar idiopática, favoreciendo la acumulación de matriz extracelular característica de esta enfermedad. por otro lado, se observa el efecto de la expresión de dichas proteínas sobre el procesamiento y expresión de tres microRNAs relevantes en el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática, miRNA-21, Let-7d y miRNA-155.

Debido al papel que desempeñan los microRNAs en la patología de la fibrosis pulmonar idiopática y la relación de la edición de las proteínas ADAR, se ha dado por hecho que en la biogénesis de los microRNAs la edición de los pri-miRNAs y pre-miRNAs regula el procesamiento de los miRNAs y puede dar como resultado la supresión del procesamiento mediado por Drosha y Dicer, o la acumulación de pri-miRNAs ricos en inosinas en el núcleo (Winter Julia. et.al, 2009). Como consecuencia, los niveles del microRNA maduro disminuyen. Algunos microRNAs se procesan de manera más eficiente cuando son editados por ADAR (Savva, Y. A., Rieder, L. E., & Reenan, R. A. 2012). En otros casos, el pri-miRNA es procesado por el complejo Drosha/DGCR8 dando lugar a la formación de nuevas isoformas, mientras que, en otros casos, la edición no permite que el pre-miRNA sea reconocido por Exportin 5 y exportado al citoplasma (Heale, B.S. et.al. 2009). En resumen, varios pri-miRNAs y pre-miRNAs son sujeto de edición mediada por ADAR y esto puede inhibir su procesamiento y la producción de miRNAs maduros, afectando la unión de los miRNAs al complejo RISC o re-dirigiéndolos a un nuevo grupo de mRNAs blanco (Yang, W. et.al.2006).

La función biológica de la edición en secuencias de RNA no codificantes no se describe completamente. En lo que respecta a los miRNA, sobre los cambios A-a-I es que regulan los niveles

de dsRNA celulares, que, si no se mantienen bajo control, son potentes desencadenantes de la vía de señalización y silenciamiento génico (Tomaselli, S.,2013).

Dentro de los miR involucrados en la patología de FPI se encuentra miR-21.

Como se ha mencionado anteriormente, los fibroblastos son las células que producen mayor cantidad de matriz extracelular, y las cuales se encuentran muy activas en la FPI (Pardo, Annie and Selman, Moises, 2017). De esta manera, al llevar a cabo la expresión de moléculas pro-fibrosantes como TGFB-1, el cual tiene un papel importante en el inicio de la FPI; debido a que induce la diferenciación de fibroblastos a miofibroblastos en el sitio de lesión y la producción de matriz extracelular, se puede observar que durante la inhibición durante 24 hrs con el inhibidor de pentostatina en las concentraciones que van de 10^{-7} a 10^{-10} M (véase figura, 5A) existe una disminución significativa de la expresión de TGFB-1, respecto al control. De esta forma, y conforme a los resultados obtenidos la expresión de miR-21 disminuye (véase figura 6), ya que Mir-21 es inducida por TGFB-1 a nivel pulmonar principalmente en fibroblastos/miofibroblastos, en donde, miR-21 reprime a SMAD7 promoviendo la activación de fibroblastos mediada por TGF- β (Chenggui, Miao; Youyi, Xiong; Guoxue, Zhang; & Jun Chang. 2018). Así que, aunque aún no se entienda del todo el mecanismo de inhibición de pentostatina sobre ADAR y la edición a este microRNA se sabe que miR-21 es blanco potencial de edición mediada por ADAR en adenosinas específicas, tiene cuatro adenosinas con una probabilidad $\geq 50\%$ de ser editadas por estas enzimas, dichas adenosinas se encuentran en la región de siembra del microRNA, sin embargo; dos de ellas se encuentran cerca de la región de corte de Dicer. Cuando es editado, la formación de la estructura de doble cadena imperfecta impide el reconocimiento del microRNA por la enzima Dicer se favorece la acumulación del pri-miRNA-21 en el núcleo, lo que podría tener como consecuencia, la disminución o el incremento de la maduración de miRNA-21 (Eggington, J. M., Greene, T., & Bass, B. L. 2011). En este caso, la pentostatina como inhibidor de ADAR, puede actuar como un potente y selectivo inhibidor del sitio de la edición de RNA, ya que a las 24 hrs de exposición se observó una disminución en la expresión de este microRNA, el cual se encuentra aumentado en pacientes con FPI al participar en un circuito de retroalimentación positiva con TGF- β favoreciendo el proceso fibrótico, dichos inhibidores serían valiosas herramientas de investigación para estudiar las consecuencias de la edición en sitios específicos (Li, Gen et. al., 2014)

Otro miR relacionado con la patología de fibrosis pulmonar idiopática es el miR-155, en donde en la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en ratones, se desarrolla fibrosis pulmonar exarcebada,

además del aumento de la secreción de TGF β 1, la producción y depósito de colágeno del tipo I y III, acompañada de la desregulación de los receptores x del hígado (LXR) alfa, un gen diana de miR-155 en fibroblastos de pulmón y macrófagos (Li, H. et.al. 2016). Para la expresión de colágena del tipo III se observa que el periodo de inhibición de 3 horas, existe un aumento significativo en la expresión de esta molécula, conforme el tiempo de exposición con pentostatina aumenta, a las 12 y 18 horas, existe una disminución significativa para colágena del tipo III, en la concentración de 10^{-10} M , sin embargo, para la expresión del miR-155 en la misma concentración y en los mismo tiempos hay un aumento en la expresión de este microRNA, de acuerdo a lo que menciona (chengguio Miao. Et.al.2018) la sobreexpresión de miR-155 reduce el fenotipo de fibrosis en FPI y la inhibición LXR alfa, así mismo se redujo en la fibrosis pulmonar experimental y en los fibroblastos de pulmón. De esta manera la vía LXRalfa/ miR- 155 puede ser una nueva diana diagnóstica y terapéutica en FPI. Por otro lado, para la expresión de colágena tipo I a las 18 horas con pentostatina, existe una disminución significativa en la expresión de esta molécula, sin embargo, en la expresión de microRNAs en el mismo tiempo no hay cambios significativos en la expresión. Por otro lado, se sabe muy poco acerca del efecto de la pentostatina como inhibidor de ADAR, así como la propia edición de ADAR en miR-155, estudios recientes demuestran que este microRNA es crucial para la generación de fibrosis, ya que la eliminación de miR- 155 puede anular el proceso fibrótico (Mousa G. Eissa and Carol M. Artlett. 2019). Estas observaciones fundamentales significan que miR-155 es parte integral de la colocación de colágeno y media la señalización de TGF- β 1 en este entorno patológico. (Angulo, M., Lecuona, E., & Sznajder, J. I. 2012) encontraron que la regulación negativa de la expresión de miR-155 causaba una síntesis reducida de colágeno, de esta manera puede que la inhibición de ADAR contribuya a la disminución en el depósito de colágeno, como se observa en los tiempos de 12 y 18 hrs para colágeno de tipo III y II respectivamente., aunque aún no se conoce del todo el mecanismo de este proceso, sin embargo, pueda relacionarse con los diferentes mecanismos de ADAR para llevar a cabo la edición de estos microRNAs.

Y por último se encuentra let-7d que se ha reportado, su expresión se encuentra disminuida en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática, cuyos niveles en el epitelio alveolar se correlaciona con la capacidad vital forzada (pandit et.al.2015). La citocina TGF- β reprime la transcripción de let-7d, determinando un incremento de HMGA2 (gen que codifica una proteína que pertenece a la familia de proteínas del grupo de alta movilidad cromosómica), una de las dianas del miR let-7d, tanto TGF- β como HMGA2 han sido implicados en el desarrollo de la TEM (la capacidad de las células epiteliales para cambiar en células mesenquimales) en la fibrosis pulmonar (B.C. Willis, Z. Borok. 2007). De

acuerdo a los resultados obtenidos al llevar a cabo la expresión del microRNA miR-let7d, para la estimulación con 3 hrs del inhibidor; se observa un aumento de la expresión de miR-let-7d en la concentración del inhibidor de 10^{-7} M en comparación con la concentración de 10^{-9} M en donde (*p=0.038666, figura 8A) en fibroblastos pulmonares HIPF-286 con un valor de (**p<0.05), sin embargo, no existe diferencia, respecto al control (ver figura, 8 A). Por otro lado, para el estímulo de 12 hrs se observa un aumento significativo en la expresión de este microRNA, al llevar a cabo la comparación de cada uno de los grupos, respecto al control, en la concentración de 10^{-10} M del inhibidor (*p=0.037623, figura 8C) en fibroblastos pulmonares. De acuerdo a lo reportado por (Pandit, K. V, et.al., 2010) la regulación por disminución de la expresión de let-7d provoca una transición mesenquimatosa epitelial en células epiteliales in vitro e in vivo y un aumento en la deposición de colágeno en los pulmones de ratón in vivo, en contraste con lo observado en el tiempo de inhibición de 12 horas con pentostatina, existe una disminución de la expresión para colágena del tipo III (fig. 3 C) de esta manera se observa un aumento de la expresión de este microRNA en el mismo tiempo de expresión y para la misma concentración que fue de 10^{-10} M, por lo tanto, la inhibición con pentostatina para las proteínas ADAR, pudieran tener alguna relación con la disminución en el depósito de colágeno del tipo III y el aumento de la expresión del miR-let7d, como consecuencia esto puede tener implicaciones importantes en la comprensión de los mecanismos moleculares en la patología de fibrosis pulmonar idiopática , y también puede conducir al desarrollo de nuevas intervenciones terapéuticas en esta enfermedad incurable, ya que se ha demostrado que este microRNA juega un papel regulatorio clave en la prevención de la fibrosis pulmonar (Pandit, K. V., et.al., 2010).

Por otro lado, al comparar todos los tiempos y las concentraciones se puede observar que en el tiempo de inhibición de 6 a 12 horas para la molécula pro-fibrosante TGFB1, es cuando existe un aumento en la expresión, lo mismo sucede para colágena del tipo III y colágena del tipo II, aunque esta última, el aumento de la expresión abarca hasta las 18 horas de inhibición con pentostatina, esto significaría que durante ese periodo, la pentostatina ejerce su modo de acción sobre las proteínas ADAR, de esta manera se observa un cambio en la expresión de estos tres microRNA's relacionados con la inducción de un fenotipo pro-fibrosante, como se observa en la (figura 9, 10 y 11).

Para el análisis de la expresión de los microRNAs al llevar a cabo la comparación de todos los tiempos para cada concentración de pentostatina, se puede observar que para los microRNAs miR-21 y miR-let 7d (figura 12 A y B) la expresión de 3 a 24 horas se mantiene constante para las concentraciones

que van de 10^{-7} a 10^{-9} M y el grupo control, sin embargo, existe un aumento de la expresión para ambos microRNAs en el tiempo de inhibición de 18 horas y en la concentración de 10^{-10} M de pentostatina, Por otro lado, para la expresión de miR-155 (figura. 12 C) al comparar todos los tiempos para cada concentración de pentostatina, se observa que la expresión de miR-155 para las concentraciones 10^{-7} y 10^{-8} M se mantiene constante de las 3 a las 24 horas de inhibición y para la concentración de 10^{-9} M existe un aumento de la expresión en el tiempo de inhibición de 6 horas que posteriormente disminuye de las 12 a las 24 horas. Para la concentración de 10^{-10} M de pentostatina, existe un aumento de la expresión a las 18 horas de inhibición para la expresión de miR-155, que disminuye a las 24 horas. Estos resultados, sobre la edición de los microRNAs, se pueden observar con la expresión para las moléculas de TGF β 1, colágena del tipo II y III, también puede ser un indicador del tiempo de inhibición así como la concentración ideal de pentostatina usadas en posteriores investigaciones, de las moléculas involucradas en la patología de fibrosis pulmonar idiopática, donde podrían desarrollarse potentes herramientas diagnósticas y terapéuticas, sin embargo, todavía queda mucho por entender sobre el papel que desempeña cada miR en su patogenia, así como la edición de ADAR en sitios específicos para estos microRNAs y el efecto de los inhibidores de ADAR (Yang, W et.al. ,2006).

Conclusión

Con base en los resultados obtenidos en esta investigación y tomando en cuenta que los microRNAs juegan un papel importante en el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), así como la relación de la edición de las proteínas ADAR sobre estos microRNAs y el uso del inhibidor de pentostatina para dichas proteínas, se puede concluir que dichas moléculas serán herramientas de investigación valiosas para estudiar las consecuencias de la edición en sitios específicos, Además, los inhibidores podrían tener un potencial terapéutico, ya que la hiperedición en sitios específicos se correlaciona con ciertos estados de la enfermedad, así mismo nos permite tener una visión más clara en la comprensión de los mecanismos moleculares en la patología de fibrosis pulmonar idiopática , y también puede conducir al desarrollo de nuevas intervenciones terapéuticas en esta enfermedad incurable, con base en lo anterior, los avances en la investigación de esta patología en México permitirán un mejor abordaje diagnóstico/ terapéutico en enfermedades intersticiales del pulmón.

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO SISTEMAS BIOLÓGICOS
LICENCIATURA QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGICA

PROYECTO: Determinación del Efecto de Pentostatina como inhibidor de las Proteínas Adenosin Desaminasas en Los microRNAs Relacionados con la Inducción de un Fenotipo Profibrosante en Fibroblastos Pulmonares

PROYECTO GENÉRICO: Evaluación de productos relacionados con la salud

ALUMNA: SUSANA SÁNCHEZ RUIZ

MATRÍCULA: 2142035123

DIRECCIÓN: Calle Cuauhtémoc # 12 Col. El Rosal, La Magdalena Contreras, C.P. 10600, CDMX.

TELÉFONO: 55-39-63-69-68

CORREO ELECTRÓNICO: susaru92@gmail.com

ASESOR EXTERNO:

Dr. Víctor Manuel Ruiz López jefe
de laboratorio de Biología
Molecular del INER.

ASESOR INTERNO:

DRA. ANA LAURA ESQUIVEL CAMPOS
Departamento de Sistemas Biológicos

Fecha de inicio: México, CDMX a 01 de octubre de 2018.

Fecha de terminación: México, CDMX a 17 de junio de 2019.

Fecha de entrega: México, CDMX a 26 enero de 2019.

Resumen

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es un prototipo de enfermedad pulmonar crónica, progresiva y mortal, caracterizada por fibrosis pulmonar progresiva e irreversible de etiología desconocida, en donde se van acumulando proteínas de la matriz extracelular, lo que conduce a una disminución de la función pulmonar, y en última instancia, insuficiencia respiratoria y la muerte (Lederer & Martínez, 2018). La fibrosis pulmonar idiopática (FPI), es una de las tres causas más comunes de morbilidad y mortalidad de Enfermedad Pulmonar Intersticial (Mejía, Mayra. et.al., 2016). Los microRNAs pequeñas moléculas de RNA, juegan un papel importante en el desarrollo de la fibrosis pulmonar idiopática (FPI), han surgido como blancos terapéuticos en múltiples enfermedades, como la fibrosis pulmonar idiopática (Pandit, Milosevic, & Kaminski, 2011). La edición de RNA es uno de los mecanismos postranscripcionales para introducir cambios en las secuencias de RNA codificadas por el genoma. En el reino animal el tipo de edición más común al RNA es el cambio de un nucleótido por otro mediado por las desaminasas de adenosina (ADAR) que actúan sobre el RNA, La evidencia reciente muestra que las desaminasas de adenosina que actúan sobre el RNA (ADAR) pueden editar los microRNA (Yang, W., et.al., 2006), como consecuencia la edición de un miRNA puede afectar las interacciones de emparejamiento de bases y puede redirigir el miRNA, cambiando en última instancia la secuencia del mRNA objetivo (Diaz-Piña Gabriela, 20018), es por ello que se necesitan inhibidores de la edición de RNA capaces de bloquear la desaminación en adenosinas específicas (Mizrahi, Schirle, & Beal, 2013). Tales moléculas serán herramientas de investigación valiosas para estudiar las consecuencias de la edición en sitios específicos. La participación de las proteínas ADAR en diversos trastornos de salud provocó numerosos intentos de desarrollar inhibidores como un agente terapéutico potencial. Varios compuestos naturales y sintéticos no relacionados estructuralmente con diversos grados de potencia han sido reportados como inhibidores de Deaminasas de adenosina, entre ellos, la 2'-desoxicoformicina o pentostatina. Dichos inhibidores pueden ser útiles en estudios diseñados para proporcionar una comprensión del papel fisiológico de ADAR tanto en el estado normal como en enfermedades como en la fibrosis pulmonar idiopática (Kandalkar et al., 2017). Es por ello que en esta investigación se determinó el efecto de la pentostatina como inhibidor de ADAR1 y ADAR2 y el efecto que tenía la maduración de los microRNAs relacionados con la inducción de un fenotipo profibrosante en fibroblastos pulmonares fibróticos.

Fuentes de Información

Angulo, M., Lecuona, E., & Sznajder, J. I. (2012). Role of MicroRNAs in lung disease. *Archivos de bronconeumología*, 48(9), 325–330.

B.C. Willis, Z. Borok. (2007). TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 293, pp. L525-L534. <http://dx.doi.org/10.1152/ajplung.00163.2007>.

Barreto-Rodríguez, José O., Mejía, Mayra E., & Buendía-Roldán, Ivette. (2015). Panorama actual de la fibrosis pulmonar idiopática en México. *Neumología y cirugía de tórax*, 74(4), 256-261.

Bushati, N., & Cohen, S. M. (2007). microRNA Functions. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23(1), 175–205. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123406>.

Chenggui Miao, Youyi Xiong, Guoxue Zhang, Jun Chang. (2018) MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis, new research progress and their pathophysiological implication. *Experimental Lung Research* 44:3, pages 178-190.

Cho, D.-S. C., Yang, W., Lee, J. T., Shiekhattar, R., Murray, J. M., & Nishikura, K. (2003). Requirement of dimerization for RNA editing activity of adenosine deaminases acting on RNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(19), 17093–17102. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213127200>.

Díaz-Piña, G., Ordoñez-Razo, R. M., Montes, E., Páramo, I., Becerril, C., Salgado, A., ... Ruiz, V. (2018). The Role of ADAR1 and ADAR2 in the Regulation of miRNA-21 in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Lung*, 196(4), 393–400. <https://doi.org/10.1007/s00408-018-0115-9>.

Eggington, J. M., Greene, T., & Bass, B. L. (2011). Predicting sites of ADAR editing in double-stranded RNA. *Nature communications*, 2, 319.

Heale, B. S., Keegan, L. P., McGurk, L., Michlewski, G., Brindle, J., Stanton, C. M., ... O'Connell, M. A. (2009). Editing independent effects of ADARs on the miRNA/siRNA pathways. *The EMBO journal*, 28(20).

Hopkins, R. B., Burke, N., Fell, C., Dion, G., & Kolb, M. (2016). Epidemiology and survival of idiopathic pulmonary fibrosis from national data in Canada. *European Respiratory Journal*, 48(1), 187–195. <https://doi.org/10.1183/13993003.01504-2015>.

Hutchinson, J., Fogarty, A., Hubbard, R., & McKeever, T. (2015). Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review. *The European Respiratory Journal*, 46(3), 795–806. <https://doi.org/10.1183/09031936.00185114>.

Jiang, X., Tsitsiou, E., Herrick, S. E., & Lindsay, M. A. (2010). MicroRNAs and the regulation of fibrosis. *The FEBS journal*, 277(9), 2015–2021.

Kandalkar, S. R., Ramaiah, P. A., Joshi, M., Wavhal, A., Waman, Y., Raje, A. A., ... Barawkar, D. A. (2017). Modifications of flexible nonyl chain and nucleobase head group of (+)-erythro-9-(2'-s-hydroxy-3'-s-nonyl) adenine [(+)-EHNA] as adenosine deaminase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(20), 5799–5819. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.09.015>.

- Kung, C.-P., Maggi, L. B. J., & Weber, J. D. (2018). The Role of RNA Editing in Cancer Development and Metabolic Disorders. *Frontiers in Endocrinology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00762>.
- Lederer, D. J., & Martinez, F. J. (2018). Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 378(19), 1811–1823. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1705751>.
- Ley, B., Collard, H. R., & King, T. E. (2011). Clinical Course and Prediction of Survival in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 183(4), 431–440. <https://doi.org/10.1164/rccm.201006-0894CI>.
- Li, Gen; Nakagome, Izumi; Hirono, Shuichi; Itoh, Tomoo; & Fujiwara, Ryoichi. (2014). Inhibition of adenosine deaminase (ADA)-mediated metabolism of cordycepin by natural substances. *Pharmacology Research & Perspectives*, Vol. 3 Iss. 2, e00121 Page 2.
- Li, H., Zhao, X., Shan, H., & Liang, H. (2016). MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis: involvement in pathogenesis and potential use in diagnosis and therapeutics. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 6(6), 531–539.
- Liu, G., Friggeri, A., Yang, Y., Milosevic, J., Ding, Q., Thannickal, V. J., ... Abraham, E. (2010). miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(8), 1589–1597. <https://doi.org/10.1084/jem.20100035>.
- Longo, Dan L, MD; Lederer, David; Martínez, Fernando J, MD. (2018). Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *The New England Journal Of Medicine*, Volume 378, No. 19, 1811-182.
- Mejía, Mayra; Buendía-Roldán, Ivette; Mateos-Toledo, Heidegger; Estrada, Andrea; Espinoza-Hernández, Manuel; Juárez-Hernández, Fortunato; Vargas-Domínguez, Claudia; Selman, Moisés. (2016). Primer Consenso Mexicano sobre Fibrosis Pulmonar Idiopática. *Neumol Cir Torax*, Vol. 75 - Núm. 1, 32-51.
- Milosevic, J., Pandit, K., Magister, M., Rabinovich, E., Ellwanger, D. C., Yu, G., ... Kaminski, N. (2012). Profibrotic role of miR-154 in pulmonary fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 47(6), 879–887. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2011-0377OC>.
- Mizrahi, R. A., Schirle, N. T., & Beal, P. A. (2013). Potent and Selective Inhibition of A-to-I RNA Editing with 2'-O-Methyl/Locked Nucleic Acid-Containing Antisense Oligoribonucleotides. *ACS Chemical Biology*, 8(4), 832–839. <https://doi.org/10.1021/cb300692k>.
- Mousa G. Eissa and Carol M. Artlett *. (2019). The MicroRNA miR-155 Is Essential in Fibrosis. *Non-Coding RNA*, 5, 23, 1-12.
- Nishikura, K. (2013). A-to-I RNA editing in human disease. Retrieved from <https://hstalks.com/t/2475/a-to-i-rna-editing-in-human-disease/>.
- Orlandi, C., Barbon, A., & Barlati, S. (2012). Activity regulation of adenosine deaminases acting on RNA (ADARs). *Molecular Neurobiology*, 45(1), 61–75. <https://doi.org/10.1007/s12035-011-8220-2>.
- Pandit, K. V; Corcoran, David; Yousef, Hanadie; Yarlagadda, Manohar; Tzouveleakis, Argyris; Gibson, Kevin F; Konishi, Kazuhisa; Yousem, Samuel A; Singh, Mandal; Handley, Daniel; Richards, Thomas;

- Selman, Moises; Watkins, Simon C; Pardo, Annie; Ben-Yehudah, Ahmi; Bouros, Demosthenes; Eickelberg, Oliver; Ray, Prabir; Benos, Panayiotis V; Kaminski, Naftali. (2010). Inhibition and Role of let-7d in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. Vol. 182, No. 2. pp 220-229.
- Pandit, K. V., & Milosevic, J. (2015). MicroRNA regulatory networks in idiopathic pulmonary fibrosis. *Biochemistry and Cell Biology*, 93(2), 129–137. <https://doi.org/10.1139/bcb-2014-0101>.
- Pandit, K. V., Milosevic, J., & Kaminski, N. (2011). MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 157(4), 191–199. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2011.01.012>.
- Pardo, Annie and Selman, Moises. (2017). Fibroblast Senescence and Apoptosis. “One-Two Punch” to Slow Down Lung Fibrosis? *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, Volume 56 Number 2, 145-146.
- Roberts, J. T., Patterson, D. G., King, V. M., Amin, S. V., Polska, C. J., Houserova, D., Borchert, G. M. (2018). ADAR Mediated RNA Editing Modulates MicroRNA Targeting in Human Breast Cancer. *Processes (Basel, Switzerland)*, 6(5).
- Savva, Y. A., Rieder, L. E., & Reenan, R. A. (2012). The ADAR protein family. *Genome biology*, 13(12), 252.
- Schirle, N. T., Goodman, R. A., Krishnamurthy, M., & Beal, P. A. (2010). Selective inhibition of ADAR2-catalyzed editing of the serotonin 2c receptor pre-mRNA by a helix-threading peptide. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 8(21), 4898–4904. <https://doi.org/10.1039/c0ob00309c>.
- Slotkin, W., & Nishikura, K. (2013). Adenosine-to-inosine RNA editing and human disease. *Genome Medicine*, 5(11), 105. <https://doi.org/10.1186/gm508>.
- Tomaselli, S., Bonamassa, B., Alisi, A., Nobili, V., Locatelli, F., & Gallo, A. (2013). ADAR enzyme and miRNA story: a nucleotide that can make the difference. *International journal of molecular sciences*, 14(11), 22796–22816. doi:10.3390/ijms141122796.
- Vuga, L. J., Ben-Yehudah, A., Kovkarova-Naumovski, E., Oriss, T., Gibson, K. F., Feghali-Bostwick, C., & Kaminski, N. (2009). WNT5A is a regulator of fibroblast proliferation and resistance to apoptosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 41(5), 583–589. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2008-0201OC>.
- Winter, Julia; Jung, Stephanie; Keller, Sarina; Gregory Richard I. and Diederichs, Sven. (2009). Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology* volume, 11, pages228–234.
- Wulff BE., Nishikura K. (2011) Modulation of MicroRNA Expression and Function by ADARs. In: Samuel C. (eds) *Adenosine Deaminases Acting on RNA (ADARs) and A-to-I Editing*. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 353. 168-187.
- Yang, L., Huang, P., Li, F., Zhao, L., Zhang, Y., Li, S., ... Liu, Y. (2012). c-Jun amino-terminal kinase-1 mediates glucose-responsive upregulation of the RNA editing enzyme ADAR2 in pancreatic beta-cells. *PLoS One*, 7(11), e48611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048611>.
- Yang, W., Chendrimada, T. P., Wang, Q., Higurashi, M., Seeburg, P. H., Shiekhattar, R., & Nishikura, K. (2006). Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13(1), 13–21. <https://doi.org/10.1038/nsmb1041>.