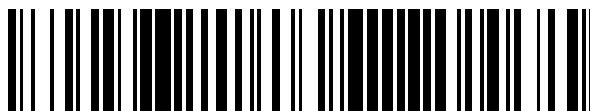


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 938 737**

51 Int. Cl.:

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 1/12 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.11.2019 PCT/EP2019/080748**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.05.2020 WO20094865**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.11.2019 E 19812682 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2022 EP 3876948**

54 Título: **Uso de microARN mir-27a-5p para tratar la inflamación intestinal inducida por *Clostridium difficile***

30 Prioridad:

09.11.2018 FR 1860380

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

14.04.2023

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY (50.0%)
Bâtiment Breguet 3 rue Joliot Curie
91190 Gif-sur-Yvette, FR y
ASSISTANCE PUBLIQUE - HÔPITAUX DE PARIS
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**KANSAU, IMAD;
KOBESSY, PHILIPPE HUSSEIN;
LARRAZET, CÉCILE y
MARVAUD, JEAN-CHRISTOPHE**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 938 737 T3

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

DESCRIPCIÓN

Uso de microARN mir-27a-5p para tratar la inflamación intestinal inducida por *Clostridium difficile*

Sumario de la invención

- 5 Los presentes inventores han identificado un miARN capaz de modular fuertemente la respuesta inflamatoria inducida por *Clostridium difficile*. Por ello, proponen incorporar este miARN a una composición farmacéutica para prevenir o reducir los efectos deletéreos de esta infección en los intestinos de los pacientes infectados. Este microARN es miR-27a-5p. Ventajosamente, este miARN puede asociarse a una matriz, incorporarse a partículas o ser transportado por un vector. Puede administrarse a personas infectadas con fines terapéuticos.

Descripción del estado de la técnica

- 10 *Clostridium difficile* es la principal bacteria enteropatógena responsable de infecciones posantibióticos en los países industrializados [1, 2]. La exposición a antibióticos, la hospitalización y la edad avanzada son los principales factores de riesgo asociados a la infección por *C. difficile* (ICD) [1]. La ICD puede ir desde una diarrea leve hasta una colitis pseudomembranosa grave y potencialmente mortal.

- 15 El aumento de la incidencia y gravedad de las ICD en los últimos años coincide con la aparición de clones epidémicos, en particular cepas del ribotipo 027. Este aumento ha ido acompañado de un incremento del coste de la asistencia [3, 4]. El coste del tratamiento asociado a la ICD en EE.UU. se estima en 3.000 millones de dólares al año, con previsiones similares para Canadá [5-8]. En Estados Unidos, la carga económica anual de la ICD para el sistema sanitario se estima en unos 4.800 millones de dólares al año en sobrecostes en centros de cuidados intensivos [3]. La mayoría de estos costes se atribuyeron a episodios primarios de ICD, con un coste de 12.607 dólares por caso [9]. En Europa, el Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades (CEPCM) estima que los costes de la gestión de la ICD ascienden a unos 4.400 millones de dólares al año [10]. En doce años, los sobrecostes de la ICD pueden haber aumentado entre un 27% y un 93%, dependiendo del país [11; 39]. En Francia, las estimaciones de los sobrecostes pueden variar entre 1.666 y 5.867 euros por caso de ICD [12].

- 25 Estos elevados costes están relacionados en gran medida con la necesidad de aislamiento del paciente y con estancias hospitalarias más largas. Sin embargo, es probable que se subestime en gran medida la carga total de la ICD, ya que aún no se han definido los costos de las recurrencias, los eventos adversos causados por la ICD (complicaciones), el costo de la atención en centros de cuidados a largo plazo y los costos sociales. Este es también el caso de la ICD comunitaria (extrahospitalaria).

- 30 Las toxinas citolíticas de *C. difficile* A y B (conocidas como TcdA y TcdB, respectivamente) contribuyen directamente a la patología asociada con las ICD [13, 14], pero otros factores desempeñan un papel en la colonización y patogenidad de la bacteria. Entre estos factores, se cree que los flagelos, que confieren motilidad y quimiotaxis a las bacterias [15], desempeñan un papel en la respuesta inflamatoria intestinal a través de la activación de las vías de señalización de las MAPK (Mitogen-activated Protein Kinases, proteínas quinasas activadas por mitógenos) y de NF-κB, mediante la interacción con el receptor celular de la respuesta inmunitaria innata TLR5 (por Toll-like receptor 5) [16]. En esta respuesta proinflamatoria, la vía NF-κB parece ser la predominante. Además, *in vivo* en un modelo murino de ICD, las toxinas actuaron en cooperación con los flagelos de *C. difficile* para inducir una respuesta inflamatoria, lo que sugiere un papel sinérgico de las toxinas y los flagelos en la respuesta inflamatoria intestinal [17]. La gravedad de la inflamación intestinal se correlaciona con la gravedad de las presentaciones clínicas de las ICD.

- 40 Se han descrito diferentes mecanismos de regulación de las vías de señalización de los receptores celulares de la respuesta inmunitaria innata, los TLR (*Toll-Like Receptors*). Entre estos mecanismos, los microARN (miARN), secuencias de ARN no codificantes de 21-24 nucleótidos, responsables de la regulación postranscripcional de los genes a través de su acción específica sobre los ARNm [18], desempeñan un papel como inmunomoduladores de la respuesta innata a través de la regulación de las vías dependientes de los TLR. Los miARN, cuya expresión sería inducida por la activación de los TLR, modulan la respuesta inflamatoria a través de la inhibición de los efectores de las cascadas de señalización. Se cree que afectan a la expresión de dianas efectoras, factores de transcripción de las vías de inflamación y los propios receptores TLR [19, 20].

Hasta la fecha, nunca se ha demostrado o sugerido que sea posible disminuir eficazmente la respuesta inflamatoria intestinal inducida por *Clostridium difficile*, utilizando un miARN que module la vía de señalización de los TLR, por ejemplo, la vía NF-κB.

- 50 Sin embargo, los miARN son moléculas que se sabe que no tienen efectos nocivos en los tejidos normales. Actualmente se consideran eficaces candidatos a fármacos de nueva generación, sobre todo para tratar cánceres ([40]).

- 55 En este contexto, sería muy ventajoso identificar un miARN capaz de modular fuertemente la respuesta inflamatoria inducida por *Clostridium difficile*, por ejemplo inhibiendo de manera suficientemente fuerte la vía NF-κB sobreactivada durante esta infección. La incorporación de dicho miARN a una composición farmacéutica proporcionaría un fármaco capaz de prevenir o reducir los efectos deletéreos de esta bacteria en los intestinos de los pacientes infectados.

Descripción detallada de la invención

En línea con esto, los presentes inventores han estudiado la expresión de un panel de miARN potencialmente implicados en la vía de señalización TLR5-NF- κ B *in vitro* e *in vivo*, en el modelo de células epiteliales intestinales humanas Caco-2 y en un modelo murino de DIC.

5 Se comprobó que el miARN conocido en la literatura como "miR-27a-5p" se sobreexpresaba significativamente con el tiempo en células Caco-2 estimuladas por flagelos de *C. difficile* o infectadas con la bacteria entera (Figura 1). Estos resultados muestran que este miARN desempeña un papel en la respuesta inducida por los flagelos de *C. difficile*. Además, el análisis de la expresión *in vivo* de miR-27a-5p en el ciego de ratones con microbiota convencional o ratones KO para TLR5 (*tlr5*^{-/-}) infectados con *C. difficile* o un mutante no flagelado, reveló que este
10 miARN también se sobreexpresa en el ciego de ratones infectados con la bacteria salvaje, mientras que no se observó ninguna variación en la expresión de este miARN en el ciego de ratones infectados con un mutante no flagelado o en el ciego de ratones KO *tlr5*^{-/-} infectados con la cepa salvaje (Figura 4). Por último, se administró por vía intravenosa un mimico de este miARN ("miR-27a-5p-mimic") en un modelo murino de ICD para estudiar la respuesta del huésped responsable de las lesiones tisulares y las graves manifestaciones clínicas. Los resultados de este experimento
15 muestran que el miR-27a-5p-mimic reduce significativamente las manifestaciones clínicas y anatomopatológicas causadas por la bacteria durante la infección en este modelo murino (Figuras 5 y 6). Este resultado proporciona una prueba de concepto de un papel importante de este miR-27a-5p en la modulación de la respuesta inflamatoria durante la ICD.

20 Concretamente, los resultados presentados a continuación demuestran que los flagelos de *C. difficile* inducen la sobreexpresión de miR-27a-5p, lo que disminuye el grado de respuesta inflamatoria y, en consecuencia, reduce las manifestaciones clínicas observadas durante la infección intestinal por *C. difficile*.

Este trabajo destaca el papel crítico de miR-27a-5p en la disminución de la respuesta inflamatoria inducida por las toxinas y flagelos de *C. difficile* y en la prevención (o disminución) de las lesiones de la mucosa causadas por esta inflamación. Por lo tanto, este miARN influye en la presentación clínica y el pronóstico de la ICD.

25 Para reducir los graves efectos deletéreos de la infección por esta bacteria, los presentes inventores proponen utilizar este miARN como ingrediente activo en una composición terapéutica.

En un primer aspecto, la presente invención se dirige a una composición farmacéutica que contiene un miR-27a-5p-mimic, para su uso en la prevención o disminución de lesiones intestinales en un sujeto que padece una infección por *Clostridium difficile*.

30 En el contexto de la presente solicitud, el término "miARN" se utiliza para referirse indistintamente a un microARN (o miARN) o "micro-RNA". Se trata de ARN no codificantes cortos de 20-25 nucleótidos que se unen a los ARNm diana e inhiben su traducción. Estos miARN pueden estar en forma bicatenaria (precursor o dúplex) o monocatenaria (forma madura, lista para unirse al ARNm diana).

35 El miARN conocido como "miR-27a-5p" es un ARN bicatenario que tiene en ratones y seres humanos la misma secuencia SEQ ID NO:1 (AGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCA). Se identificó en 2001 ([41]) y se ha implicado en la vía NF- κ B en células aórticas ([42]), y en el cáncer ([43]). También se ha identificado en las células intersticiales de la válvula mitral ([46]).

40 Los mecanismos celulares implicados en estos diferentes estudios son totalmente ajenos a los resultados observados por los presentes inventores: en ambos artículos [42] y [46], los receptores TLR no están implicados. En el artículo [46], la vía NF- κ B no se activa, son las vías JNK y Wnt/B-catenina las implicadas.

Además, es bien conocido en la técnica que el mismo miARN puede tener una función en determinadas condiciones y en un tipo de célula y una función completamente opuesta en otro tipo de célula. Por ejemplo, el propio miR-27a puede tener una función oncogénica en el cáncer de mama, pero una función supresora de tumores en los cánceres de próstata ([47]; [48]). A diferencia de los presentes inventores, algunos equipos han sugerido incluso que miR-27a
45 aumenta la respuesta inflamatoria mediada por IL-10 en macrófagos activados ([49]). También se sabe que miR-146a tiene efectos opuestos según las células consideradas (efecto proinflamatorio en células endoteliales estimuladas por sobrenadantes de monocitos activados por LPS [50] o efecto antiinflamatorio en células endoteliales vasculares estimuladas por LPS [51]).

50 Por "miR-27a-5p-mimic" se entiende aquí cualquier molécula sintética de ARN de doble cadena que tenga una secuencia igual o similar a la de miR-27a-5p para modular la misma diana genética. Preferiblemente, esta molécula sintética difiere de los miARN naturales en que ha sido modificada químicamente para aumentar su estabilidad frente a las RNasas y las proteínas del complejo RISC ("RNA-induced silencing

Complex", complejo de silenciamiento inducido por ARN).

Tales modificaciones químicas son, por ejemplo, la metilación, la adición de grupos fosforotioato (sustitución del oxígeno no enlazante del grupo fosfato por un átomo de azufre), la adición de grupos metilo (por ejemplo, 2'-O-metilo o 2'-O-metoxietilo) en diferentes lugares de la estructura ([44]).

- Por "secuencia similar" se entiende aquí una secuencia de ácido nucleico que tiene un porcentaje de identidad mayor o igual al 70%, preferiblemente mayor o igual al 80%, aún más preferiblemente mayor o igual al 90%, con la secuencia conocida de miR-27a-5p natural (por ejemplo, SEQ ID NO:1). Por "porcentaje de identidad" entre dos secuencias de ácidos nucleicos se entiende un porcentaje de nucleótidos idénticos entre las dos secuencias a comparar, obtenido tras el mejor alineamiento (alineamiento óptimo), siendo este porcentaje puramente estadístico y estando las diferencias entre las dos secuencias distribuidas aleatoriamente en toda su longitud.
- Este porcentaje de identidad puede calcularse mediante cualquier procedimiento de análisis de secuencias bien conocido por el experto. El porcentaje de identidad puede determinarse tras la alineación global de las secuencias a comparar tomadas en su conjunto. Además de la determinación manual, es posible determinarlo mediante el algoritmo de Needleman y Wunsch (1970). Para las secuencias de nucleótidos, la comparación de secuencias puede realizarse utilizando cualquier software conocido por los expertos, como el software Needle. Los parámetros utilizados pueden ser los siguientes "Gap Open" igual a 10,0, "Gap Extend" igual a 0,5 y la matriz EDNAFULL (versión EMBOSS de NCBI NUC4.4). Este porcentaje también puede determinarse tras la alineación local de las secuencias que se van a comparar. Además de manualmente, es posible utilizar el algoritmo de Smith y Waterman (1981) para determinar este porcentaje. Preferentemente, el porcentaje de identidad definido en el contexto de la presente invención se determina mediante un alineamiento global de las secuencias a comparar en toda su longitud.
- Preferiblemente, el "miR-27a-5p-mimic" es una molécula sintética de ARN bicatenario que contiene al menos 5 o 6 nucleótidos consecutivos de miR-27a-5p [la parte que se une al ARNm diana]. El resto de su secuencia de oligonucleótidos tiene entonces preferiblemente un porcentaje de identidad con la otra parte del miARN de al menos el 70%.
- Aún más preferiblemente, dicho "miR-27a-5p-mimic" es el ARN bicatenario que tiene la secuencia SEQ ID NO:2 (5'-AGGGCUUAGCUGCUUGUGACCCC-3') y que tiene la secuencia complementaria SEQ ID NO:3 (5'-GGGGGUCACAAGCAGCUAAGCCCU-3') (o su complemento), comercializado por RIBOXX con el número M-00303-0200 Mimético CONmiR® in vivo.
- En la composición farmacéutica de la invención, el miARN mímico puede estar desnudo. También puede estar formando complejo con moléculas químicas cargadas positivamente o nanopartículas (es decir, partículas con un diámetro inferior a 1 µm), o envuelto en materiales protectores, por ejemplo, cápsulas, liposomas, etc., con el fin de promover su estabilidad y transfectabilidad (entrada en las células diana).
- Cualquier medio de estabilización conocido para promover el transporte y la orientación de los siARN puede utilizarse para facilitar la administración del mímico de la invención, ya que estas moléculas tienen la misma estructura. Tales medios son, por ejemplo, los descritos en [40] y [45].
- En una realización preferente, dicho miR-27a-5p-mimic está por tanto asociado con (o incluido en) un vector, matriz o partículas que promueven su estabilidad y transfectabilidad.
- Si es transportado por un vector, dicho vector es preferentemente un virus recombinante seleccionado de entre: adenovirus, retrovirus, lentivirus, virus adenoasociados (AAV), virus del herpes, citomegalovirus (CMV), vaccinia virus, etc.
- Ventajosamente, dicho virus recombinante es un virus defectivo, por ejemplo un AAV defectivo.
- El término "virus defectivo" se utiliza aquí para describir un virus que es incapaz de replicarse en una célula diana. Normalmente, el genoma de los virus defectivos carece de al menos una de las secuencias necesarias para la replicación del virus en la célula infectada. Estas regiones pueden eliminarse, dejar de ser funcionales o sustituirse por otras secuencias y, en particular, por el ácido nucleico que codifica el péptido de interés. No obstante, es preferible que el virus defectuoso conserve las secuencias de su genoma necesarias para la encapsulación de las partículas víricas.
- Este vector también puede ser un bacteriófago, ya que estos ya se han utilizado con éxito para transportar ARNs. En el contexto de la presente invención pueden utilizarse bacteriófagos como MS2, Phi29, etc.
- Si dicho miR-27a-5p-mimic se asocia a partículas, éstas pueden ser las ya propuestas para el transporte de ARNs. Algunos ejemplos son los liposomas (DOPC), las nanopartículas lipídicas, las nanocélulas (tipo EnGeneC EDV), las nanopartículas de sílice, los exosomas, etc.
- Más concretamente, estas partículas pueden ser nanopartículas de poli(alquilcianoacrilato), preferiblemente recubiertas de quitosano. El miARN mímico de la invención puede adsorberse fácilmente allí por formación de pares de iones, como se demostró previamente para los siARN [38].

Si dicho miR-27a-5p-mimic está incluido en una matriz, dicha matriz puede ser una emulsión lipídica neutra (NLE), polietilenimina (PEI), poli(lactida-co-glicolida) (PLGA), etc.

Más concretamente, dicho miR-27a-5p-mimic puede formar complejo en un polímero catiónico como "in vivo-jet PEI[®]", que es bien conocido por transportar eficazmente cualquier tipo de ácidos nucleicos *in vivo* en diferentes órganos, sin provocar una respuesta inflamatoria.

También es posible administrar el mimico de la invención conjugado con una proteína o molécula química de interés, por ejemplo seleccionada entre: lípidos, colesterol, PEG, ciclodextrina, quitosano, dendrímeros (de poli(amidoamina) o poli(propilenimina), N-acetil-D-galactosamina (GalNAc), etc.

La presente invención también se dirige a procedimientos para tratar a sujetos que padecen infección por *Clostridium difficile*. Estos procedimientos incluyen una etapa de administración de la composición farmacéutica de la invención a pacientes que han sido infectados con *Clostridium difficile*.

Por último, la presente invención se refiere al uso del mimico de la invención, tal como se ha definido anteriormente, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de pacientes que han sido infectados con *Clostridium difficile*.

El diagnóstico de ICD se realiza clásicamente por i) sospecha en presencia de un cuadro clínico de diarrea, colitis con presencia de moco y sangre en las heces, desarrollo de complicaciones como megacolon, colitis pseudomembranosa, perforación intestinal, o ii) detección en las heces de toxinas o de la propia bacteria (cultivo microbiológico, PCR, prueba GDH).

Una prueba de citotoxicidad detecta la presencia de toxinas libres, mientras que un cultivo toxigénico detecta la presencia de bacterias. Actualmente se dispone de procedimientos normalizados (ensayos inmunoenzimáticos, PCR, amplificaciones isotérmicas) para detectar rápidamente esta infección en caso de síntomas (diarrea).

En una realización particular, los sujetos que se benefician del tratamiento de la invención son sujetos con una de las formas moderadas a graves de ICD. Por ejemplo, se trata de sujetos con diarrea grave y persistente (más de 3 días) con deshidratación, formas disenteriformes (con dolor abdominal y presencia de sangre y moco en las heces), formas complicadas por dilatación del colon (megacolon) y colitis pseudomembranosa (a menudo detectada por endoscopia). También puede tratarse de pacientes con comorbilidades (cardiopatías, diabetes, patologías hepato-digestivas, patologías quirúrgicas, etc.) en los que la ICD suele manifestarse en formas graves.

Estos sujetos pueden ser animales (domésticos o no, por ejemplo gatos, perros, equinos) o seres humanos. Preferiblemente, estos sujetos no son niños pequeños.

Por "tratamiento" se entiende aquí un tratamiento curativo (destinado al menos a aliviar o detener el desarrollo de lesiones intestinales inducidas por bacterias) o profiláctico (destinado a reducir el riesgo de que se produzcan dichas lesiones).

La composición farmacéutica utilizada en la invención contiene, como principio activo, el ácido nucleico descrito anteriormente (eventualmente asociado o protegido por partículas, vectores, lípidos, etc.). También contiene preferentemente un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En la presente descripción, se entiende por "excipiente farmacéuticamente aceptable" un compuesto (o una combinación de compuestos) que se incluye en una composición farmacéutica, pero que no provoca reacciones secundarias y que permite, por ejemplo, facilitar la administración del compuesto o compuestos activos, aumentar su vida útil y/o su eficacia en el organismo, aumentar su solubilidad en solución o mejorar su conservación. Estos excipientes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y serán adaptados por el experto en la materia según la naturaleza y el modo de administración del compuesto o compuestos activos elegidos.

Preferentemente, los mímicos de la invención se administrarán por vía sistémica, en particular por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal o subcutánea, o por vía oral. Más preferiblemente, se administrarán en varias ocasiones, repartidas a lo largo del tiempo.

Sus modos de administración, dosis y formas de dosificación óptimos pueden determinarse según los criterios que suelen tenerse en cuenta para establecer un tratamiento adecuado para un paciente, como la edad o el peso corporal del paciente, la gravedad del estado general del paciente, la tolerancia del tratamiento y los efectos secundarios observados.

Los ingredientes activos también pueden formularse como microcápsulas, posiblemente con uno o más portadores aditivos. Para la preparación de estas microcápsulas, los principios activos suelen combinarse con diluyentes adecuados, estabilizantes adecuados, agentes que favorecen la liberación sostenida de las sustancias activas o cualquier otro tipo de aditivo para formar un núcleo central que luego se recubre con un polímero adecuado (por ejemplo, una resina hidrosoluble o una resina insoluble en agua). Para ello se utilizarán técnicas conocidas por el

experto. A continuación, las microcápsulas así obtenidas se formulan eventualmente en unidades de dosificación apropiadas.

Los mímicos de la invención también pueden formularse en liposomas. Los liposomas se forman a partir de fosfolípidos que se dispersan en un medio acuoso y forman espontáneamente vesículas bicapa concéntricas multilamelares. Estas vesículas suelen tener de 25 nm a 4 µm de diámetro y pueden sonificarse, lo que da lugar a la formación de vesículas unilamelares más pequeñas, de 200 a 500 Å de diámetro, que contienen una solución acuosa en su núcleo. Los liposomas serán especialmente ventajosos para administrar el fármaco a una diana celular o tisular específica. Para ello, los lípidos pueden acoplarse químicamente a moléculas de orientación, como péptidos de orientación (por ejemplo, hormonas) o anticuerpos.

La dosificación depende naturalmente del vector/complejo considerado, del modo de administración, de la fase de la infección, de la edad del paciente y de su estado. Algunos autores han utilizado dosis intravenosas de miARN de 10 mg/kg. También pueden utilizarse dosis más pequeñas (por ejemplo, 3 y 5 mg/kg al día).

Cuando el mímico de la invención se combina con un polímero catiónico u otro vector, se pueden utilizar dosis más altas (25mg/kg) en una sola toma, o en varias veces, repitiendo las inyecciones.

Leyenda de las figuras

Figura 1. Cinética de expresión de miR-27a-5p por células Caco-2 incubadas con flagelina FliC o *C. difficile*. (A) Cinética de expresión de miR-27a-5p por células Caco-2 incubadas con FliC durante 12 h. (B) Las células se incubaron con FliC o se infectaron con la cepa salvaje R20291 (WT) o su mutante no flagelado (FliC-) durante 1 h. La expresión de miR-27a-5p se midió mediante qRT-PCR con el oligonucleótido de la Tabla 1. Las barras de cada punto corresponden a las desviaciones estándar de las medias de al menos 3 experimentos independientes.

Figura 2. Inhibición de la sobreexpresión de miR-27a-5p mediante inhibidores químicos específicos de NF-κB y MAPK en células Caco-2 incubadas con la flagelina FliC o la cepa R20291 de *C. difficile*. Las vías NF-κB y MAPK se inhibieron 1 h antes de la estimulación o infección celular mediante 20 µM de BMS 345541 (inhibidor de IKKα), 20 µM de U0126 (inhibidor de MEK1/2), 20 µM de PD98059 (inhibidor de MEK1), 20 µM de SP600125 (inhibidor de JNK) o 3 µM de SB203580 (inhibidor de p38) en monocapas celulares. Se analizó la expresión de miR-27a-5p tras la incubación de las células con FliC (A) o la infección con R20291 de la cepa salvaje (WT) (B) durante 1 h. La expresión de miARN se midió mediante qRT-PCR con el oligonucleótido de la Tabla 1. Las barras de cada punto corresponden a las desviaciones estándar de las medias de al menos 3 experimentos independientes.

Figura 3. Efecto inhibitorio de miR-27a-5p sobre la vía NF-κB en células Caco-2 incubadas con flagelina. Las células Caco-2 se transfectaron con el respectivo miR-27a-mimic, inhibidor de miR-27a, así como con los respectivos oligonucleótidos de control del mímico y del inhibidor. La expresión de miR-27a-5p se midió mediante qRT-PCR con el oligonucleótido 5'-AGGGCTTAGCTGCTTGAG-3' (SEQ ID NO:4). (A). La degradación del efector IκB-α que señala la activación de la vía NF-κB se midió mediante transferencia Western- (B). (C) También se midió la expresión de los ARNm de las citocinas proinflamatorias TNFα e IL-8 (oligonucleótidos Tabla 2), así como (D) la producción de IL-8 en el sobrenadante del cultivo celular mediante ELISA. Las barras de cada punto son las medias ± desviaciones estándar de al menos 3 experimentos independientes (* p<0.01).

Figura 4. Expresión de miR-27a-5p en el ciego de ratones infectados por *C. difficile*. (A) Expresión de miR-27a-5p medida por qPCR en el ciego de ratones con microbiota convencional infectados con R20291 de tipo salvaje (WT) o el mutante isogénico no flagelado (FliC-). El tercer grupo corresponde a la expresión de miR-27a-5p en ratones KO *tlr5*^{-/-} infectados con la cepa WT. Las barras horizontales corresponden a las medias por grupo. (B) Correlación de la expresión de miR-27a-5p con la expresión de ARNm de KC (equivalente a IL-8 humana, oligonucleótidos Tabla 2) en el ciego de ratones convencionales infectados con R20291 WT.

Figura 5. Protocolo de tratamiento miR-27a-5p-mimic en el modelo murino de DCI. Grupos de ratones hembra C57BL/6 de 4-5 semanas de edad con microbiota convencional son pretratados con un cóctel de antibióticos añadidos al agua potable desde D-6 a D-3 antes de la infección en D0. (0,4 mg/mL de kanamicina, 0,035 mg/mL de gentamicina, 850 U/mL de colistina, 0,215 mg/mL de metronidazol y 0,045 mg/mL de vancomicina). En D-1, se inyectan 0,2 mL de una solución de clindamicina (1,25 mg/mL) por vía intraperitoneal (IP). En D0, los ratones se infectan por sonda oral con 0,5 mL de una suspensión que contiene 10⁵ esporas de la cepa de tipo salvaje (0,5 mL de agua estéril para los ratones de control). A continuación, los ratones de los grupos tratados recibieron 3 dosis de 50 µg (es decir, 25 mg/kg) de suspensión de miR-27a-5p mimic / *in vivo*-jetPEI® en el momento de la infección, 8 h y 24 h después de la infección, por vía intravenosa (150 µl inyectados retro-orbitalmente). Se observa el estado clínico de los animales y, en D2, se sacrifican los ratones para el análisis cecal.

Figura 6. Inflamación cecal en ratones infectados con *C. difficile*. Grupos de ratones C57BL/6 con microbiota convencional (n = 9-10) fueron infectados y tratados o no con miR-27a-mimic. El ciego se recogió en D2 después

de la infección. Representación del ciego entero y sección histológica (**A, B**) de un ratón de control (no infectado y tratado con miR-27a-mimic), (**C, D**) de un ratón infectado con la cepa de tipo salvaje R20291 WT y (**E, F**) de un ratón infectado con la misma cepa y tratado con miR-27a-mimic. (**G**) Puntuaciones histológicas de inflamación (Tabla 3) para ratones individuales en cada grupo. Las líneas horizontales representan las puntuaciones medias de cada grupo (no se muestra la puntuación 0 del grupo de control). El círculo rojo indica los 3 animales que mostraron manifestaciones de ICD. (**H**) transferencia Western de lisados cecales revelados con un anticuerpo contra I κ B- α y actina. La imagen muestra una transferencia representativa de un experimento. La densidad de bandas se mide con el software Fusion y se calculan los ratios I κ B- α /actina. Para el control negativo, la proporción se normalizó a 1 y las proporciones de las demás muestras se trasladaron al control negativo. Las barras de cada punto corresponden a las medias $\pm$ desviaciones estándar de cada grupo de animales. * $p < 0.05$.

Ejemplos

Materiales y procedimientos:

I. Cepas bacterianas

Se utilizaron dos cepas de *C. difficile* en la infección de modelos animales: la cepa de tipo salvaje R20291 (NAP1/027) y su mutante isogénico, con el gen de la flagelina *fliC* inactivado (Δ FliC). Esta cepa mutada se construyó utilizando la tecnología Clostron (N. Minton, Universidad de Nottingham), que consiste en la inactivación insercional de genes [22]. Estas dos cepas se conservan como formas vegetativas o esporas, congeladas a -80°C .

II. Purificación de la proteína FliC recombinante de *C. difficile* mediante cromatografía de afinidad

La flagelina FliC de la cepa R20291 (NAP1/027) de *C. difficile* se produjo en una cepa de *Escherichia coli* BL21 que albergaba el plásmido pET28 que codifica la proteína FliC con una cola N-terminal de histidina (FliC-His), construido previamente en el laboratorio.

Un precultivo de *E. coli* BL21 pET28 en medio LB (Luria Bertani), que contiene $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ de kanamicina (que permite el mantenimiento del plásmido) se diluye a 1/100 en 2 L del mismo medio y se incuba a 37°C durante 3 h. A continuación, se induce la síntesis de FliC-His añadiendo isopropiltiogalactósido (IPTG) 1 mM . Tras 3 h de incubación a 37°C , el cultivo se centrifuga durante 15 min a 4°C a 4000 rpm. A continuación, el precipitado se resuspende en 50 mL de tampón de lisis que contiene Tris HCl 25 mM pH 8, NaCl 300 mM , 1 mg/mL de lisozima (Sigma) y $500\text{ }\mu\text{L}$ de inhibidor de proteasas P-8465 (Sigma). La lisis se lleva a cabo a 4°C durante 1 hora con agitación. A continuación, se realizan tres ciclos de congelación-descongelación a -80°C seguidos de 5 ciclos de sonicación de 45 s cada uno para lisar las bacterias. A continuación, se centrifuga la suspensión durante 40 min a $10\,000\text{ g}$ a 4°C . El pellet se recupera en 10 mL de tampón de equilibrio que contiene NaH_2PO_4 50 mM , 8 M de urea y NaCl 300 mM . La suspensión se centrifugó durante 40 min a $10\,000\text{ g}$ y el sobrenadante se recuperó y filtró a través de un filtro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$. A continuación, se puso en contacto durante 1 h a 4°C con 2 mL de resina cargada con cationes divalentes de Co^{++} (Talon[®], Clontech) previamente lavada con 2 volúmenes de agua ultrapura (Millipore[®]) y 3 volúmenes de tampón de equilibrio. A continuación, la mezcla se carga en la columna, la resina se lava 3 veces con tampón de equilibrio y la proteína FliC-His se eluye con 3 mL de tampón de elución que contiene NaH_2PO_4 45 mM , urea 8 M , NaCl 270 mM e Imidazol 150 mM . A continuación, el eluido se dializa contra PBS a 4°C utilizando un casete de diálisis Slide-A-Lyser[®] (Thermo Scientific) que permite la diálisis de moléculas con un peso molecular inferior a $10\,000\text{ Da}$.

Tras la diálisis, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) seguida de una tinción con azul de Coomassie al 0,25% para verificar la pureza de la muestra. También se deposita en el gel una gama estándar de BSA (albúmina sérica bovina) fracción V (Euromedex[®]) y se establece la curva de calibración mediante el programa ImageJ midiendo la densidad de las bandas. Por último, la concentración de FliC-His se determina midiendo la densidad de la banda correspondiente a la proteína recombinante, tras depositar $10\text{ }\mu\text{L}$ de eluido, y se calcula utilizando la ecuación de la curva de calibración.

III. Cultivo celular

Se utilizó la línea celular Caco-2 (adenocarcinoma colónico). Es uno de los modelos celulares más utilizados para modelar el epitelio intestinal *in vitro*. Las células Caco-2 son células epiteliales intestinales humanas que expresan varios TLR, incluido el TLR5. La línea se cultiva en DMEM[®] (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) suplementado con un 15% de suero bovino fetal (FBS) y un 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco).

La línea celular se almacena en ampollas de congelación de nitrógeno líquido a -120°C en SVF con 10% de DMSO (crioprotector). Tras la descongelación, los cultivos se realizan en matraces de 25 y 75 cm^2 y se efectúan dos trasplantes cuando las células son confluentes. Las células se cuentan utilizando una célula de Malassez y, a continuación, se distribuyen en nuevas cajas. Las células cultivadas se mantienen en una incubadora a 37°C bajo una atmósfera que contiene un 10% de CO_2 y está saturada de vapor de agua. El medio se cambia 48 horas después de la descongelación y después todos los días. La búsqueda de contaminación por micoplasma se lleva a cabo fijando los tapetes celulares con fijador Carnoy y tiñéndolos a continuación con reactivo Hoechst (Sigma) diluido 1/2000^e. A continuación, las esteras celulares se observan mediante microscopía de fluorescencia.

IV. Infección y tratamiento celular

Las células Caco-2 se ponen en contacto con la proteína FliC-His recombinante purificada de *C. difficile* R20291 o con cepas de *C. difficile*. Se siembran placas de 24 pocillos con 5×10^5 células por pocillo y se cultivan las células hasta 3 días después de la confluencia, antes de que alcancen la polarización. Las células se agotaron 4 h antes del contacto con FliC o de la infección con las diferentes cepas de *C. difficile* para evitar la activación de las vías de señalización, lavándolas con PBS y añadiendo después 0,5 mL de medio DMEM con 1% de SVF en lugar de 15%. A continuación, las monocapas celulares se ponen en contacto con la proteína FliC-His a una concentración de 10 ng/mL con tiempos de incubación de 1, 2, 4, 6, 8, 12 y 24 h. Las células Caco-2 no contactadas con FliC-His constituyen el control negativo para cada tiempo de estudio. Al final de la cinética de incubación, se aspira el medio de cultivo de cada pocillo y las células se lisan directamente para la extracción de ARN. Cada experimento se realiza al menos tres veces de forma independiente.

Para la infección de células con *C. difficile*, la cepa R20291 de tipo salvaje o la cepa mutante no flagelada de *C. difficile* se precultiva en medio BHI líquido en cámara anaeróbica a 37°C. La suspensión bacteriana se centrifuga a 5000 rpm durante 4 min y se lava con 10 mL de PBS. Tras otra centrifugación a 5000 rpm durante 4 min, se recupera el precipitado en 500 µl de PBS, obteniéndose una suspensión bacteriana de 2×10^9 bacterias/mL. se ponen en contacto 250 µl de suspensión bacteriana con las células, obteniéndose una MOI (*Multiplicity of Infection, Multiplicidad de Infección*) de 50 bacterias/célula.

Cuando se indicó, las vías NF-κB y MAPKs se inhibieron químicamente 1 h antes de la estimulación o infección celular añadiendo a las monocapas celulares 20 µM de BMS 345541 (inhibidor de IKKα) (Sigma), 20 µM U0126 (inhibidor de MEK1/2), 20 µM PD98059 (inhibidor de MEK1), 20 µM SP600125 (inhibidor de JNK) o 3 µM SB203580 (inhibidor de p38) (Cell Signaling, Ozyme).

V. Sobreexpresión e inhibición de miR-27a-5p en células Caco-2

Se sobreexpresó miR-27a-5p en células Caco-2 cultivadas utilizando 25 nM del mimico Syn-hsa-miR-27a-5p, mientras que la inhibición se logró con 250 nM de Anti-hsa-miR-27a-5p, ambos adquiridos en Qiagen. Antes de la transfección, se sembraron células Caco-2 en una placa de 24 pocillos a razón de 6×10^4 células/pocillo y se transfectaron con el reactivo de transfección HiPerfect (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se incubaron con los complejos de transfección en sus condiciones normales de crecimiento y se cosecharon 48 h después de la transfección. Como controles negativo y positivo se utilizaron el *miScript Inhibitor Negative Control* y el *miScript Negative Control* (Qiagen), respectivamente. Para monitorizar la eficacia de la transfección, se incorporó por transfección el *AllStars Hs Cell Death Control siRNA* (Qiagen) en células en paralelo en todas las transfecciones, y se alcanzó una eficacia de transfección de al menos el 75%. Cuando fue necesario, se estimularon las células con flagelina FliC purificada durante 1 h. El nivel de miR-27a-5p y la expresión de los genes de la interleucina 8 (IL-8) y el TNFα se analizaron mediante RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR), el nivel de la proteína IκB se evaluó mediante transferencia Western y el nivel de IL-8 en el sobrenadante celular se analizó mediante ELISA.

VI. Modelo animal

El ratón C57BL/6 con microbiota convencional se ha utilizado como modelo animal de infección por *C. difficile* (ICD). Ratones hembra de cuatro a cinco semanas (Charles River Laboratories) mantenidos en un aislador estéril, alimentados con comida irradiada y agua tratada en autoclave. A la llegada de los animales, se recogen las heces para comprobar si hay colonización intestinal por *C. difficile*.

En este modelo de infección, los ratones fueron pretratados con un cóctel de antibióticos añadidos al agua potable durante 4 días (de D-6 a D-3 antes de la infección en D0). Este cóctel consta de 0,4 mg/mL de kanamicina, 0,035 mg/mL de gentamicina, 850 U/mL de colistina, 0,215 mg/mL de metronidazol y 0,045 mg/mL de vancomicina. Después se interrumpió el tratamiento durante dos días. Un día antes de la infección (D-1), se inyectaron 0,2 mL de una solución de clindamicina de 1,25 mg/mL por vía intraperitoneal (IP). En el día 0 (infección), los ratones se infectaron por sonda oral con 0,5 ml de una suspensión que contenía 10^5 esporas de la cepa de tipo salvaje o ΔFliC, mientras que a los ratones de control se les administró por sonda 0,5 ml de agua estéril.

La solución de miR-27a-5p-mimic utilizada para el tratamiento de ratones se preparó mezclando el miR-27a-5p-mimic (sintetizado por Riboxx®, Alemania) con un reactivo de transfección in vivo, *in vivo-jetPEI*® (Polyplus-transfection®, Francia). Tras la resuspensión de miR-27a-5p-mimic liofilizado en agua milipore estéril, se diluyeron 50 µg de miR-27a-5p-mimic con solución estéril de glucosa (concentración final de glucosa 5%); también se diluyeron 6 µl del reactivo in vivo-jet PEI con solución estéril de glucosa (concentración final de glucosa 5%) y estas dos soluciones se mezclaron volumen a volumen (concentración final de de miR-27a-5p-mimic 0,33 µg/µL). A continuación, los ratones pertenecientes al grupo infectado y tratado fueron tratados con la suspensión de miR-27a-5p mimic / *in vivo-jetPEI*® en 3 dosis de 50 µg (es decir, 25 mg/kg), en el momento de la infección, 8 h y 24 h post-infección, por vía intravenosa (150 µl inyectados retro-orbitalmente).

Tras la infección, los ratones se mantuvieron en observación durante 2 días y se registraron las manifestaciones clínicas de la ICD, diarrea, erizamiento y reducción de la actividad. También se pesó diariamente a los ratones para observar posibles cambios de peso relacionados con la infección.

- 5 En D2 post-infección, los ratones fueron sacrificados y el ciego de cada ratón fue cosechado, cortado longitudinalmente para extraer suficiente contenido cecal para la enumeración bacteriana. A continuación, el ciego se lavó en PBS, se sumergió en solución RNlater (Qiagen) para estabilizar los ARN y se cortó en tres partes: una parte para estudios histológicos, otra para la extracción inmediata de ARN totales y la última para la extracción de proteínas (para inmuno transferencia).

VII. Recuento bacteriano

- 10 El contenido cecal recogido se suspendió en 10 mg/mL de PBS (solución madre). Para el recuento de las formas vegetativas, se realizó un rango de dilución de $1/10^e$ en PBS: 100 (1 mg/mL), 10^{-1} (0,1 mg/mL), 10^{-2} (0,01 mg/mL) y 10^{-3} (0,001 mg/mL). Así, 100 μ L de cada dilución se sembraron en medio de agar BHI (*Brain Heart Infusion*) suplementado con un 3% de sangre de caballo desfibrinada y un 0,4% de suplemento Oxoid (125 mg de D-cicloserina y 4 mg de Cefoxitina). Para el recuento de esporas, el contenido cecal se sometió a un choque de alcohol
- 15 incubando la solución madre con 1 volumen de etanol absoluto durante 10 minutos, con el fin de matar las formas vegetativas. La suspensión resultante se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm y el pellet se recuperó en 1 volumen de PBS. A continuación, se realizó un intervalo de dilución de $1/10^e$: 100 (1 mg/mL) y 10^{-1} (0,1 mg/mL). La solución madre y cada dilución se inocularon en el mismo medio con 0,1% de taurocolato (Sigma) para permitir la germinación y, por tanto, la enumeración de las esporas de *C. difficile*. Los medios se incubaron en una cámara de atmósfera anaeróbica controlada (atmósfera con un 5% de H_2 , un 5% de CO_2 y un 90% de N_2) a 37°C durante 48 h.
- 20

VIII. Extracción de ARN

- El kit miRNeasy mini® (Qiagen) permitió la extracción y purificación de los ARN totales incluyendo miARN de cultivos celulares de la línea Caco-2 y de tejidos cecales de ratón, a diferencia de la mayoría de kits comerciales que no permiten la extracción de moléculas de ARN menores de 200 nucleótidos. Este kit permite la lisis de la muestra a partir
- 25 del uso de una mezcla de fenol/guanidina y la posterior purificación del ARN total mediante una columna de membrana de sílice.

- Para la extracción de ARN de las células Caco-2, se aspiró el medio de cultivo de los pocillos donde luego se agregaron 700 μ L de QIAzol. QIAzol, un agente de lisis, es una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina que permite la lisis celular, la inhibición de los ARN y la eliminación de la mayor parte del ADN y las proteínas celulares de los
- 30 lisados mediante extracción orgánica. La lisis continúa raspando las esteras celulares con un raspador y empujando el lisado hacia delante y hacia atrás varias veces con una micropipeta. A continuación, para reducir la viscosidad del lisado, se homogeneizaron las células con una jeringa y una aguja bombeándolas diez veces.

- Los ciegos de ratones sacrificados se lisaron, tras la adición de QIAzol, utilizando el FastPrep® para la homogeneización automatizada de muestras en tubos Lysing Matrix D® (MP Biomedicals). La muestra se tritura mecánicamente mediante el impacto simultáneo y multidireccional de perlas de Lysing Matrix D® durante 40 s a
- 35 velocidad 6.

- A continuación, los lisados se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos para permitir la disociación de los complejos nucleoproteicos. A continuación, se añadieron 140 μ L de cloroformo al tubo, que se agitó enérgicamente durante 15 s, se incubó durante 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó durante 15 min a 12.000 g a 4 °C, lo
- 40 que permitió la formación de 3 fases: una fase acuosa transparente que contenía el ARN (en un volumen de 350 μ L), una interfase blanca que contenía el ADN y una fase orgánica roja que contenía las proteínas. A continuación, la fase acuosa se transfirió a un tubo de recogida al que se añadieron 525 μ L de etanol absoluto (1,5 volúmenes) para garantizar las condiciones adecuadas para la unión del ARN a la columna. La mezcla resultante se transfirió a una columna de membrana de sílice con un tubo de recogida. La columna se centrifugó durante 15 s a más de 8 000 g a
- 45 temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. A continuación, se añadieron 700 μ L de tampón RWT® a la misma columna, que se lavó mediante centrifugación durante 15 s a más de 8.000 g, y se eliminó el sobrenadante. A continuación, se realizaron otros dos lavados con 500 μ L de tampón RPE® mediante centrifugación durante 15 s a más de 8.000 g. Tras el segundo lavado en tampón RPE®, se centrifugó durante 2 min a más de 8.000 g para garantizar la ausencia de etanol durante la elución del ARN. La elución del ARN se realizó añadiendo 40 μ L de agua libre de RNasa
- 50 (RNase-free) a la columna, seguida de centrifugación durante un minuto a más de 8.000 g.

- Por último, el ARN total extraído se cuantificó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop® (ND-2000) añadiendo 2 μ L de muestra. Este análisis también permite calcular la relación de absorbancia a 260 y 280 nm (A260/A280) y la relación de absorbancia a 260 y 230 nm (A260/A230), lo que permite evaluar la pureza de los ácidos nucleicos presentes en
- 55 cada muestra. La integridad de los ARN totales extraídos también se evaluó mediante análisis con el Bioanalyser Agilent® y la medición del valor del número de integridad del ARN (RIN).

IX. Análisis de la expresión de miARN mediante PCR en tiempo real

IX.1. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

9

Los miARN maduros se componen naturalmente de unos 22 nucleótidos y, a diferencia de los ARNm, no están poliadenilados. Por este motivo, se realizó la síntesis de ADNc utilizando el kit miScript RTII® (Qiagen) que contiene transcriptasa inversa y poli(A)-polimerasa, una mezcla de ácidos nucleicos (que contiene dNTPs, rATP, cebadores oligo-dT y ARN sintético como control interno), con el fin de evaluar el rendimiento de la RT y el tampón "miScript HiSpec" para la conversión selectiva de miARNs maduros en ADNc. Por lo tanto, la poliadenilación y la transcripción inversa tienen lugar en paralelo en el mismo tubo. Los miARN maduros se poliadenilan mediante poli(A)-polimerasa y se transcriben inversamente en ADNc utilizando cebadores oligo-dT. Estos cebadores tienen un *anclaje* degenerado 3' y una secuencia de etiqueta universal en el extremo 5' que permite la amplificación de miARNs maduros durante la qPCR. La combinación de poliadenilación y adición de la etiqueta universal garantiza que no se detecte ADN genómico.

Se añadió una mezcla de 4 µl de tampón HiSpec 5X miScript, 2 µl de mezcla 10X miScript Nucleics y 2 µl de mezcla "miScript Reverse Transcriptase" a 2 µg de ARN total y se realizó la síntesis de ADNc en un volumen final de 20 µl. La reacción se lleva a cabo a 37°C durante una hora y, a continuación, se inactivan las enzimas mediante una incubación de 5 minutos a 95°C. Las muestras se diluyeron 1:10 y se almacenaron a -20°C antes de la amplificación PCR.

IX.2. PCR cuantitativa (qPCR)

Los cebadores utilizados se muestran en la Tabla 1. La PCR se realizó con el kit miScript SYBR® Green PCR (Qiagen®) en el termociclador CFX96 (Bio-Rad). El kit contiene los cebadores inversos (*universal primer*) y una mezcla maestra que contiene el intercalante (SYBR Green) y la enzima ADN polimerasa HotStarTaq. Las PCR se realizaron en un volumen final de 10 µL, compuesto por 1 µL de solución molde de ADNc diluida, 9 µL de mezcla formada por el reactivo de PCR (master mix y cebadores universales) y los cebadores específicos para cada ADNc correspondiente a los miARN diana a una concentración final de 0,5 µM. El programa térmico incluyó, para todas las dianas estudiadas, una etapa inicial de activación de la enzima ADN polimerasa HotStarTaq de 15 min a 95°C, seguido de 40 ciclos, cada uno de los cuales consistió en una desnaturalización de 15 s a 94°C, una hibridación de 30 s a 55°C y una elongación de 30 s a 70°C. La amplificación fue seguida de una etapa de fusión, que permitió determinar la temperatura de fusión, o T_m , de cada amplicón, consistente en desnaturalización durante 1 min a 95°C, reasociación de las cadenas durante 2 min a 65°C y, a continuación, fusión lenta mediante calentamiento a 95°C a una velocidad de 0,5°C por segundo.

Los resultados de la PCR se expresan como un valor C_t (*Cycle threshold*) correspondiente al número de ciclos de amplificación necesarios para que la fluorescencia supere el umbral de detección del fluorómetro. Los resultados obtenidos se expresaron como expresión relativa.

	Dianas	SEQ ID NO :	Secuencia 5'-3'	Referencia
miARN humanos	hsa-let-7i-5p	5	TGAGGTAGTAGTTGTGCTG	(31)
	hsa-miR-9-5p	6	TCTTTGGTTATCTAGCTGTATGA	(32)
	hsa-miR-18a-5p	7	TAAGGTGCATCTAGTGCAGAT	(31)
	hsa-miR-19a-3p	8	TGTGCAAATCTATGCAAACTG	miRgator
	hsa-miR-27a-5p	9	AGGGCTTAGCTGCTTGTGAG	(31)
	hsa-miR-129-5p	10	CTTTTTCGGTCTGGGCTTG	(31)
	hsa-miR-132-5p	11	ACCGTGGCTTTCGATTGTTAC	(33)
	hsa-miR-147a-3p	12	GTGTGTGGAAATGCTTCTGC	(34)
	hsa-miR-150-5p	13	TCTCCCAACCTTGTACCAG	Target scan
	hsa-miR-155-5p	14	TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT	(35)
	hsa-miR-212-5p	15	ACCTTGGCTCTAGACTGCTTA	(31)
	hsa-miR-300-5p	16	TATACAAGGGCAGACTCTTC	miRgator
	hsa-miR-301a-3p	17	CAGTGCAATAGTATTGTCAAAGC	(36)
	hsa-miR-339-5p	18	TCCCTGTCTCCAGGAGCTC	(31)
	hsa-miR-382-5p	19	GAAGTTGTTCTGGTGGATTC	miRwalk
	hsa-miR-378a-5p	20	CTCCTGACTCCAGGTCCTGT	(31)
	hsa-miR-431-5p	21	TGTCTTGCCAGGCCGTCATGC	(31)
	hsa-miR-520a-5p	22	CTCCAGAGGGAAGTATTTCT	miRwalk
	hsa-miR-524-5p	23	CTACAAAGGGAAGCACTTTCTC	miRwalk
	hsa-miR-525-5p	24	CTCCAGAGGGATGCACTTTC	miRwalk
	hsa-miR-548d3p	25	TAGCAAAAAGTGCAGTTACTT	miRwalk
	hsa-miR-4766-5p	26	TCTGAAAGAGCAGTTGGTGT	Target scan
Gen de normalización	SNORD2	27	TCATCTTTCGGGACTGACCTG	(37)

Tabla 1. Cebadores utilizados para la qRT-PCR para los miARN

Las qRT-PCR para el análisis de la expresión génica de las citocinas se realizaron en las mismas condiciones utilizando los oligonucleótidos enumerados en la Tabla 2.

5

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para los análisis qRT-PCR de la expresión del ARNm.

Gen	Oligonucleótidos	SEQ ID NO:
hTNF- α	F'-CGAGTGACAAGCCTGTAGCC	28
	R'-GTTGACCTTGGTCTGGTAGG	29
hIL-8	F'-GGCACAACTTTCAGAGACAG	30
	R'-AAATTTGGGGTGGAAGGTT	31
hACTIN	F'-AGAAAATCTGGCACCACACC	32
	R'-AGAGGCGTACAGGGATAGCA	33
mKC (IL-8)	F'-GCTGGGATTCACCTCAAGAA	34

Gen	Oligonucleótidos	SEQ ID NO:
mGAPDH	R'-AGGTGCCATCAGAGCAGTCT	35
	F'- GAACTGGCAGAAGAGGCACT	36
	R'-AGGGTCTGGGCCATAGAACT	37
h= humano; m = murino. Los genes actina y GAPDH se utilizaron para normalizar		

X. Análisis de la activación de la vía de señalización NF- κ B mediante inmuno transferencia

X.1. Extracción de proteínas

- 5 El trozo de tejido cecal (aproximadamente 70 g) se colocó en 600 μ l de tampón de lisis (Tris 62 mM pH 6,8, 10% Glicerol, 1,5% SDS, 0,25% Azul de Bromofenol) en tubos Lysing Matrix[®] (MP Biomedicals) que contenían microesferas cerámicas. Los tejidos se trituraron bajo agitación mecánica con el FastPrep-24[®] (MP Biomedicals). A continuación, las muestras se almacenaron a -20 °C antes de su análisis.

X.2. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-Page)

- 10 Después de desnaturalizar las muestras (100°C en un baño de agua durante 10 min), las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones de desnaturalización (SDS-PAGE). Se depositaron ocho (8) μ l de muestra por pocillo; también se depositaron en cada gel 5 μ l de marcador de peso molecular (PageRuler[®] Plus prestained protein ladder, ThermoScientific). La migración se realizó a voltaje constante (200 V) durante 60 min en tampón de migración (Tris 25 mM, 0,1% SDS, Glicina 192 mM).

X.3. Transferencia e inmunotransferencia

- 15 La membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) se regeneró con metanol y después las proteínas se transfirieron a amperaje constante a 350 mA durante 1 h al tampón de transferencia (Tris 20 mM, Glicina 150 mM). A continuación se realizó el inmunomarcaje de la proteína I κ B- α seguido de la revelación por quimioluminiscencia. Tras la transferencia, la membrana se saturó en una mezcla de TBS (Tris 0,5 M, NaCl 1,5 M) con Tween 20 al 0,1% y leche al 5% durante 1 h. Las membranas se incubaron durante la noche a 4 °C con un primer anticuerpo específico (Ac) dirigido contra la proteína I κ B- α (anti-I κ B- α , Ac de conejo) o contra la actina (Ac de ratón) (Cell signaling[®]). Estos anticuerpos se diluyeron 1/2000 en TBS con Tween 20 al 0,1% y BSA al 5%. A continuación, las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min en TBS más Tween 20 al 0,1%. A continuación, se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, con agitación, con un segundo Ac de conejo (IgG anti-rabbit HRP linked antibody, Cell Signaling[®]) o ratón (IgG anti-mouse HRP linked antibody, Cell Signaling[®]) acoplado a peroxidasa. Las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min y luego se incubaron 1-5 min con Immobilon TM Western Chemiluminescent HRP Substrate[®]. Se revelaron las membranas y se analizaron las imágenes con el aparato Fusion[®] (Viber Lourma), con normalización de actina. La densidad de bandas se midió con el software Fusion y se calcularon los ratios I κ B- α /actina. Para el control negativo, la proporción se normalizó a 1 y las proporciones de las demás muestras se compararon con el control negativo para cada experimento.

30 XI. Análisis histológico

Las piezas de tejido cecal se almacenaron en solución de formalina durante 24 horas y luego se transfirieron a etanol al 70%. Los cortes histológicos y la tinción con hematoxilina y eosina se realizaron en la Plataforma de Inmunopatología Histológica de Ratón Clamart del Instituto de Innovación Terapéutica de París Saclay IPSIT (PHIC- 32 rue des carnets, Clamart 92140, Francia).

- 35 El análisis microscópico de las preparaciones en portaobjetos se realizó utilizando el software NDP View[®] (Hamamatsu). Se estableció una puntuación para el grado de inflamación sobre la base del edema submucoso, el infiltrado inflamatorio, lesiones epiteliales y la pérdida de células mucosas (células caliciformes). Tabla 3.

Tabla 3. Puntuación de inflamación utilizada en el análisis histológico del ciego.

1. Edema	
0	Ausencia de edema

1. Edema	
1	Edema mínimo con mínima expansión submucosa multifocal (< 2x)
2	Edema moderado con expansión submucosa multifocal a 2-3x
3	Edema grave con expansión submucosa multifocal > 3x
4	Puntuación 3 con expansión submucosa difusa
2. Infiltrado celular (400x)	
0	Sin inflamación (0-5 células)
1	Mínimo infiltrado inflamatorio neutrofílico multifocal (6-20 células)
2	Infiltrado inflamatorio neutrofílico multifocal moderado (afectación submucosa) (21-60 células)
3	Infiltrado inflamatorio neutrofílico multifocal grave (amplia afectación submucosa que puede implicar a toda la pared (61-100 células)
4	Puntuación 3 con abscesos murales grandes (>100 células)
3. Lesión epitelial	
0	Ausencia de lesión epitelial
1	Mínima lesión epitelial multifocal superficial. Descamación epitelial
2	Lesión epitelial multifocal superficial moderada. Erosión de la mucosa (mantenimiento de la arquitectura o pérdida de 1-10 células).
3	Lesión epitelial multifocal superficial grave +/- pseudomembranas. Ulceración de la mucosa (destrucción de la lámina propia o pérdida de >10 células).
4	Puntuación 3 con pseudomembranas significativas o ulceración epitelial (pérdida focal completa del epitelio)
4. Pérdida de células caliciformes (células mucosas) (400x)	
0	>28
1	11-28
2	1-10
3	<1

XII. Ensayos de citoquinas mediante ELISA

5 Los niveles de la citocina proinflamatoria IL-8 en sobrenadantes de cultivo de células Caco-2 se evaluaron mediante ELISA utilizando la prueba *Human IL-8 ELISA KIT (4Abio, China)* de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El límite de detección fue de 4 pg/mL.

XIII Prueba estadística

Las medias $\pm$ desviaciones estándar de las variables estudiadas se obtuvieron a partir de las tres réplicas; el análisis estadístico de los resultados se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney. Los valores de $P < 0,01$ o $P < 0,05$ se consideran estadísticamente significativos.

Resultados :

5 I. Búsqueda *in silico* de miARN potencialmente implicados en la regulación de la respuesta inflamatoria inducida por *C. difficile* y su flagelina FliC

Trabajos recientes muestran que *C. difficile* y su flagelina FliC inducen una respuesta proinflamatoria en las células epiteliales intestinales y en el ciego de ratón (un modelo murino de ICD), y que la vía de señalización NF- κ B es una vía predominante [16, 17]. Dado que los miARN son capaces de modular las vías de señalización actuando sobre el ARNm, se investigó el papel de estas moléculas en la regulación de la vía de señalización proinflamatoria NF- κ B inducida por la interacción de la flagelina FliC con su receptor específico TLR5 (receptor de respuesta innata) durante la ICD.

Se realizó una búsqueda *in silico* utilizando 3 algoritmos diferentes de predicción de dianas para miARN utilizados por las bases de datos miRgator, TargetScan y miRWalk. Estos algoritmos en línea se basan en la búsqueda de similitudes entre la región 3' UTR de la secuencia del ARNm de interés y la "secuencia semilla" de los miARN presentes en las bases de datos específicas de la biblioteca. También se tuvo en cuenta la literatura científica que indica un vínculo entre los miARN y varios efectores de la señalización TLR5 tras la estimulación por flagelos bacterianos.

Se seleccionaron ciento trece (113) miARN basándose en los criterios elegidos a partir de estas búsquedas *in silico* y de la bibliografía. Entre estos miARN, se analizaron unos veinte miARN (Tabla 1) para evaluar su cinética de expresión en células Caco-2 en contacto con la flagelina FliC de *C. difficile*, especialmente durante las primeras horas de contacto. Entre todos estos miARN analizados, el miARN "miR-27a-5p" mostró una sobreexpresión significativa, especialmente durante las primeras horas de incubación (Fig. 1A). Su sobreexpresión se confirmó cuando las células se infectaron con la cepa R20291 de *C. difficile* a las 2 h de incubación, mientras que no se observó sobreexpresión cuando las células se infectaron con el mutante no flagelado (Fig. 1B).

25 II. El miR-27a-5p desempeña un papel en la vía de señalización proinflamatoria NF- κ B inducida por *C. difficile* y su flagelina FliC.

Para analizar el impacto de la inhibición de las vías de señalización NF- κ B y MAPKs (ERK1/2, p38 y JNK) sobre la expresión de los mi-ARN identificados, estas vías se inhibieron químicamente mediante inhibidores específicos de IKK α (vía NF- κ B), y MAPK ERK1/2, p38 y JNK, 1 h antes de la estimulación de las células por FliC o bacterias. Tras 2 h de incubación de las células con FliC o la cepa R20291, la expresión de miARN-27a-5p quedó abolida (Fig. 2A y B). Se consiguió una inhibición mucho mayor (aproximadamente 40 veces) de la expresión de miR-27a-5p utilizando el inhibidor de IKK α (BMS 345541), lo que demuestra que este miARN desempeña un papel en la regulación de la vía de señalización NF- κ B proinflamatoria inducida por *C. difficile* y su flagelina (Fig. 2A y B).

35 III. El miR-27a-5p-mimic inhibe la vía de señalización proinflamatoria NF- κ B inducida por *C. difficile* y su flagelina FliC *in vitro*.

Los resultados anteriores demuestran que miR-27a-5p (SEQ ID NO:1 = AGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCA), cuya expresión es inducida por *C. difficile* y su flagelina FliC a través de la activación de NF- κ B, desempeña un papel en la regulación de esta vía NF- κ B. Se caracterizó el papel de miR-27a-5p para revelar si es un activador (proinflamatorio) o inhibidor (antiinflamatorio) de la vía NF- κ B. Para ello, se utilizaron diferentes moléculas: una molécula (oligonucleótido) que imita la actividad de esta miR-27a-5p ("miR-27a mimic") o una molécula química que antagoniza su actividad ("miR-27a-inhibitor" = Anti-hsa-miR-27a-5p).

Tras la transfección de células Caco-2 con estas dos moléculas, así como con los oligonucleótidos e inhibidores de control, se midió la expresión de miR-27a-5p tras la lisis celular. Como se muestra en la Fig. 3A, el inhibidor de miR-27a-5p reduce significativamente la expresión de este miARN en las células estimuladas con FliC, mientras que el miR-27a-mimic se expresa en gran medida. El efecto de la transfección de células con estas dos moléculas se midió en términos de degradación del efector I κ B- α que señala la activación de la vía NF- κ B, la expresión de ARNm de las citocinas proinflamatorias TNF α e IL-8, y la producción de IL-8 en el sobrenadante del cultivo celular.

El anti-miR-27a-5p (miR-27a inhibidor) induce una fuerte degradación de I κ B- α , un aumento de la expresión de los ARNm de las citocinas TNF α e IL-8, así como un aumento de la síntesis de IL-8 en el sobrenadante del cultivo (Fig. 3B, C y D), lo que sugiere que miR-27a-5p desempeña un papel inhibidor en la vía NF- κ B y, por tanto, un papel antiinflamatorio en la cascada de señalización inducida por la interacción FliC-TLR5.

En consonancia con estas observaciones, la transfección de células con el miR-27a-mimic indujo una respuesta celular antiinflamatoria caracterizada por la ausencia de degradación de I κ B- α y, por tanto, de activación de NF- κ B, una fuerte inhibición de la expresión de ARNm de citocinas TNF α e IL-8, y una ausencia de síntesis de IL-8 en el sobrenadante celular (Fig. 3B, C y D). En conjunto, estas observaciones muestran que miR-27a-5p desempeña un

papel inhibidor en la vía proinflamatoria NF- κ B tras la activación de esta vía por la interacción flagelina-TLR5. Se cree que este miARN participa en un bucle de retroalimentación de la cascada de señalización TLR5-NF- κ B.

IV. MiR-27a-5p está altamente sobreexpresado *in vivo* en el ciego de ratones infectados por *C. difficile*.

Para confirmar las observaciones realizadas *in vitro* sobre el papel potencial de miR-27a-5p en la regulación de la inflamación inducida por *C. difficile* y su flagelo, se analizó la expresión de este miR-27a-5p en el intestino (ciego) durante la infección en el modelo murino de ICD.

Se formaron dos grupos de ratones C57BL/6 hembra de 4 a 5 semanas de edad con microbiota convencional ($n = 10$ para cada grupo) y un grupo de ratones C57BL/6 KO *tlr5*^{-/-} (que no expresan TLR5, $n = 10$). Después de tratar a los animales con antibióticos durante 6 días antes de la infección para crear disbiosis (ver Materiales y Procedimientos), un grupo de ratones con microbiota convencional fue infectado por sonda intragástrica con la cepa de *C. difficile* de tipo salvaje R20291 (WT) y otro con el mutante isogénico carente de flagelos (FliC-). Un grupo de ratones KO *tlr5*^{-/-} también se infectó con la cepa WT. Se utilizó un grupo de ratones no infectados como control para establecer los ratios de expresión relativa de cada grupo. El análisis de la expresión de miR-27a-5p en el ciego de los animales mostró una mayor expresión de este miARN en el ciego de los ratones C57BL/6 con microbiota convencional infectados con la cepa WT, en comparación con la expresión observada en los ratones infectados con el mutante no flagelado (FliC-) y la de los ratones KO *tlr5*^{-/-} infectados con la cepa WT (Fig. 4A). Estos resultados indican que el flagelo de *C. difficile*, a través de su interacción con TLR5, desempeña un papel en el aumento de la expresión de miR-27a-5p en el ciego de ratones, lo que sugiere que, *in vivo*, la activación de NF- κ B tras la interacción flagelo-TLR5 descrita anteriormente [17], se correlaciona con la expresión de miR-27a-5p.

Además, el análisis de la expresión del ARNm del gen de la citocina KC de ratón, equivalente a la IL-8 humana, revela una correlación perfecta con el aumento de la expresión de miR-27a-5p, como se muestra en la Fig. 4B.

V. Un mimico de miR-27a-5p reduce la gravedad de la inflamación *in vivo* en el modelo murino de ICD.

Considerando los efectos antiinflamatorios inducidos por miR-27a-5p en células Caco-2, se analizó el efecto *in vivo* de un oligonucleótido que imita este miARN (miR-27a-5p-mimic). Este oligonucleótido se administró por vía intravenosa (IV) en el modelo murino de ICD (Fig. 5). Se analizaron tres grupos de ratones C57BL/6 hembra de 4-5 semanas de edad con microbiota convencional ($n = 9-10$ por cada grupo). Tras el tratamiento antibiótico inductor de la disbiosis, un grupo de animales no infectados fue tratado con la suspensión miR-27a-5p mimic / *in vivo*-jetPEI® a 3 dosis de 50 μ g (es decir, 25 mg/kg), en el momento de la infección, 8 h y 24 h post-infección, mediante inyección intravenosa (150 μ l inyectados retro-orbitalmente). Un segundo grupo de animales se infectó con la cepa de tipo salvaje R20291 y no se trató con el miR-mimic y un tercer grupo también se infectó con esta cepa de *C. difficile* pero se trató con el miR-27a-5p-mimic / suspensión *in vivo*-jetPEI® como para el primer grupo.

Tras la infección, como era de esperar en este modelo de ICD, los ratones infectados y no tratados con miR-27a-mimic desarrollaron signos clínicos de ICD: diarrea, pelo erizado y disminución de la actividad en D1 y D2 post-infección (Tabla 4). Sólo 3 de cada 10 animales del grupo tratado con miR27-a-mimic desarrollaron diarrea, y esto fue en D2 post-infección. Cabe señalar que la tasa de colonización intestinal de los animales infectados cuantificada por el recuento bacteriano en el contenido cecal (unidades formadoras de colonias - UFC/g) en D2 post-infección es bastante equivalente entre los grupos de ratones infectados (WT no tratado y WT + miR-27a-mimic) excluyendo la posibilidad de que la diferencia en las manifestaciones clínicas entre estos dos grupos sea el resultado de una baja colonización intestinal de los ratones.

Tabla 4. Manifestaciones clínicas de animales infectados y/o tratados por miR-27a-mimic los D1 y D2 post-infección.

Grupo de animales	Diarrea		Pelo erizado		Actividad reducida	
	D1	D2	D1	D2	D1	D2
Control negativo + miR-27a-mimic ($n = 9$)	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9	0/9
WT ($n = 9$) $1,8 \times 10^9$ UFC/g	9/9	9/9	3/9	3/9	3/9	3/9
WT+ miR-27a-mimic ($n = 10$) $3,7 \times 10^9$ UFC/g	0/10	3/10	0/10	0/10	0/10	1/10

En D2 post-infección, el análisis patológico del ciego de los animales de tipo salvaje infectados y no tratados mostró una apariencia hiperémica inflamatoria con áreas hemorrágicas y contenido cecal mucoso en comparación con el ciego normal de ratones no infectados (control negativo) como se muestra en la Fig. 6A y C. El aspecto inflamatorio del ciego se atenuó en gran medida en el grupo de ratones infectados tratados con miR-27a-mimic (Fig. 6E). En cuanto al estudio histológico de las secciones cecales, como era de esperar, se encuentra un extenso edema de la mucosa con infiltrado inflamatorio, erosión epitelial y pérdida de células caliciformes en los ciegos de los ratones infectados de tipo salvaje y no tratados con miR-27a-mimic, con una puntuación de inflamación (Tabla 3) que oscila entre 6 y 9, en comparación con una puntuación de 0 para los ratones no infectados (Fig. 6G). Por el contrario, en el grupo de animales infectados tratados con miR-27a-mimic, 6 de cada 10 ratones mostraban un ciego libre o con pocos signos de inflamación y un contenido cecal normal y libre de moco (Fig. 6E). La puntuación histológica de la inflamación fue inferior a 6 en estos animales, que mostraban principalmente infiltrado celular y edema de leve a moderado (Fig. 6F y G). Los 3 ratones de este "grupo infectado tratado con miR-27a-5p" que desarrollaron diarrea en D2 tras la infección (Tabla 4) tenían una puntuación de inflamación elevada comparable a la de los ratones infectados no tratados (Fig 6G), lo que eleva la eficacia de miR-27a-5p al 70% en este modelo murino de infección.

El análisis de la activación de la vía NF- κ B en el tejido cecal en D2 post-infección reveló una fuerte degradación de I κ B- α en el ciego de ratones infectados y no tratados en comparación con ratones no infectados, lo cual es consistente con las observaciones habituales en este modelo de ICD, así como con las manifestaciones clínicas [17]. Por el contrario, no se detectó activación de I κ B- α en el ciego de los ratones infectados tratados con miR-27a-mimic (Fig. 6H), lo que refuerza las observaciones previas de reducción de las manifestaciones clínicas y de los fenómenos inflamatorios intestinales asociados a la infección por la bacteria en este modelo murino.

CONCLUSIÓN

En conclusión, el presente trabajo destaca el papel crucial de un miARN, miR-27a-5p, en la disminución de la respuesta inflamatoria inducida por las toxinas y flagelos de *C. difficile* y, por tanto, en la prevención o disminución de lesiones de la mucosa causado por esta inflamación. Al inhibir la vía de señalización NF- κ B activada por la interacción flagelo-TLR5 durante la infección intestinal por *C. difficile*, este miARN influye en la presentación clínica y el pronóstico de la ICD.

El efecto *in vivo* de un miR-27a-5p-mimic específico dirigido a la vía de señalización proinflamatoria TLR5-NF- κ B inducida por *C. difficile* se demostró en un modelo murino de ICD. Esta molécula es capaz de reducir la respuesta deletérea de los ratones infectados por *C. difficile* al disminuir la respuesta inflamatoria intestinal en estos ratones. Estos resultados demuestran que es posible reducir los graves efectos deletéreos de la infección por esta bacteria utilizando este miARN como ingrediente activo en una composición terapéutica.

Referencias bibliográficas

1. Cloud, J. y C.P. Kelly, Actualización sobre la enfermedad asociada a *Clostridium difficile*. Curr Opin Gastroenterol, 2007. 23(1): p. 4-9.
2. Heinlen, L. y J.D. Ballard, infección por *Clostridium difficile*. Am J Med Sci, 2010. 340(3): p. 247-52.
3. Dubberke, E.R. y M.A. Olsen, Burden of *Clostridium difficile* on the healthcare system. Clin Infect Dis, 2012. 55 Suppl 2: p. S88-92.
4. Miller, M.A., et al, Morbidity, mortality, and healthcare burden of nosocomial *Clostridium difficile*-associated diarrhea in Canadian hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol, 2002. 23(3): p. 137-40.
5. Carrico, R.M., Amenaza silenciosa. *C. difficile* y su amenaza para los centros sanitarios. Health Facil Manage, 2011. 24(6): p. 43-5.
6. Dubberke, E.R. y A.I. Wertheimer, Revisión de la literatura actual sobre la carga económica de la infección por *Clostridium difficile*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2009. 30(1): p. 57-66.
7. O'Brien, J.A., et al, The emerging infectious challenge of *clostridium difficile*-associated disease in Massachusetts hospitals: clinical and economic consequences. Infect Control Hosp Epidemiol, 2007. 28(11): p. 1219-27.
8. Rebmann, T. y R.M. Carrico, Preventing *Clostridium difficile* infections: an executive summary of the Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology's elimination guide. Am J Infect Control, 2011. 39(3): p. 239-42.
9. McGlone, S.M., et al, La carga económica de *Clostridium difficile*. Clin Microbiol Infect, 2012. 18(3): p. 282-9.
10. Kuijper, E.J., B. Coignard, y P. Tull, Emergence of *Clostridium difficile*-associated disease in North America and Europe. Clin Microbiol Infect, 2006. 12 Suppl 6: p. 2-18.

11. Wiegand, P.N., et al, Clinical and economic burden of *Clostridium difficile* infection in Europe: a systematic review of healthcare-facility-acquired infection. *J Hosp Infect*, 2012. 81(1): p. 1-14.
12. Eckert, C. y F. Barbut, [*Clostridium-difficile*-associated infections]. *Med Sci (París)*, 2010. 26(2): p. 153-8.
- 5 13. Kuehne, S.A., et al, El papel de la toxina A y la toxina B en la infección por *Clostridium difficile*. *Nature*, 2010. 467(7316): p. 711-3.
14. Lyras, D., et al, Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature*, 2009. 458(7242): p. 1176-9.
15. Tasteyre, A., et al, Role of FliC and FliD flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infect Immun*, 2001. 69(12): p. 7937-40.
- 10 16. Batah, J., et al. *Clostridium difficile* flagella predominantly activate TLR5-linked NF-kappaB pathway in epithelial cells. *Anaerobe*, 2016. 38: p. 116-24.
17. Batah, J., et al. *Clostridium difficile* flagella induce α respuesta proinflamatoria en el epitelio intestinal de ratones en cooperación con toxinas. *Sci Rep*, 2017. 7(1): p. 3256.
18. Bentwich, I., et al, Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet*, 2005. 37(7): p. 766-70.
- 15 19. He, X., Z. Jing, y G. Cheng, MicroRNAs: new regulators of Toll-like receptor signalling pathways. *Biomed Res Int*, 2014. 2014: p. 945169.
20. Taganov, K.D., et al, NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006. 103(33): p. 12481-6.
21. Bader, A.G., et al. developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene Ther*, 2011. 18(12): p. 1121-6.
22. Minton, N., et al, The development of *Clostridium difficile* genetic systems. *Anaerobe*, 2004. 10(2): p. 75-84.
23. Häsler R, et al. 2012. El reconocimiento de patrones microbianos provoca distintas firmas funcionales de micro-ARN en monocitos humanos primarios. *PloS One* 7:e31151.
24. Norman E Buroker X-HN. 2013. Procedimientos de diagnóstico médico Los miARN circulantes de las manchas de sangre secas se asocian al mal de altura.
- 25 25. Romay MC, et al. 2015. Regulación de la señalización NF- κ B por glicerofosfolípidos oxidados y miRs-21-3p y -27a-5p inducidos por IL-1 β en células endoteliales aórticas humanas. *J Lipid Res* 56:38-50.
26. Nahid MA, et al. 2013. Regulación de la tolerancia mediada por TLR2 y la tolerancia cruzada a través de la modulación de IRAK4 por miR-132 y miR-212. *J Immunol Baltim Md* 190:1250-1263.
- 30 27. Liu G, et al. 2009. miR-147, un microARN que se induce tras la estimulación del receptor Toll-like, regula las respuestas inflamatorias de los macrófagos murinos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:15819-15824.
28. Ceppi M, et al. 2009. El microARN-155 modula la vía de señalización de la interleucina-1 en células dendríticas humanas derivadas de monocitos activadas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2735-2740.
29. Lu Z, et al. 2011. miR-301a como activador de NF- κ B en células de cáncer de páncreas. *EMBO J* 30:57-67.
- 35 30. Wang B, et al. 2011. Evaluación sistemática de tres plataformas de perfiles de microARN: Microarray, Beads Array y Quantitative Real-Time PCR Array. *PLoS ONE* 6:e17167.
31. Häsler R, et al. 2012. El reconocimiento de patrones microbianos provoca distintas firmas funcionales de micro-ARN en monocitos humanos primarios. *PloS One* 7:e31151.
32. Norman E Buroker X-HN. 2013. Procedimientos de diagnóstico médico Los miARN circulantes de las manchas de sangre secas se asocian al mal de altura.
- 40 33. Nahid MA, et al. 2013. Regulación de la tolerancia mediada por TLR2 y la tolerancia cruzada a través de la modulación de IRAK4 por miR-132 y miR-212. *J Immunol Baltim Md* 190:1250-1263.
34. Liu G, et al. 2009. miR-147, un microARN que se induce tras la estimulación del receptor Toll-like, regula las respuestas inflamatorias de los macrófagos murinos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:15819-15824.
- 45 35. Ceppi M, et al. 2009. El microARN-155 modula la vía de señalización de la interleucina-1 en células dendríticas humanas derivadas de monocitos activadas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2735-2740.

36. Lu Z, et al. 2011. miR-301a como activador de NF- κ B en células de cáncer de páncreas. *EMBO J* 30:57-67.
37. Wang B, et al. 2011. Evaluación sistemática de tres plataformas de perfiles de microARN: Microarray, Beads Array y Quantitative Real-Time PCR Array. *PLoS ONE* 6:e17167.
- 5 38. Martimprey H et al, 2010. New Core-Shell nanoparticles for the intravenous delivery of siRNA to experimental thyroid papillary carcinoma, *Pharmaceutical Research*, 2010.
39. Reigadas Ramírez E, Bouza ES. Carga económica de la infección por *Clostridium difficile* en los países europeos. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1050:1-12
40. Rupaimoole R. & Slack F.J., MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2017 Mar;16(3):203-222.
- 10 41. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *La ciencia*. 2001 Oct 26;294(5543):853-8.
42. Romay et al Regulation of NF- κ B signaling by oxidized glycerophospholipid and IL-1 β induced miRs-21-3p and -27a-5p in human aortic endothelial cells. *J Lipid Res*. 2015 Ene;56(1):38-50
43. Wu et al Dirigida al Eje de Señalización del EGFR por el MicroRNA- 27a* Oncotarget. 2013 Sep;4(9):1388-98
- 15 44. Geary RS, Pharmacokinetic properties of 2'-O-(2-methoxyethyl)-modified oligonucleotide analogs in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Mar;296(3):890-7.
45. Baumann V. y Winckler J. miRNA-based therapies: strategies and delivery platforms for oligonucleotide and non-oligonucleotide agents. *Future Med Chem*. 2014;6(17):1967-84
- 20 46. Chen H. miR-27a protects human mitral valve interstitial cell from TNF- α -induced inflammatory injury via up-regulation of NELL-1. *Braz J Med Biol Res*. 2018; 51(6)
47. Arros-Silva D, Costa-Pinheiro P, Duarte H, Sousa EJ, Evangelista AF, Graça I, et al. Regulación del microRNA-27a-5p por metilación del promotor y señalización de MYC en la carcinogénesis de próstata. *Cell Death Dis*. 7 feb 2018;9(2):167
- 25 48. Mertens-Talcott SU, Chintharlapalli S, Li X, Safe S. El microARN-27a oncogénico se dirige a genes que regulan factores de transcripción de proteínas de especificidad y el punto de control G2-M en células de cáncer de mama MDA-MB-231. *Cancer Res*. 15 nov 2007;67(22):11001-11.
49. Xie N. et al, miR-27a regula la respuesta inflamatoria de los macrófagos dirigiéndose a la IL-10. *J Immunol*. 2014 Jul 1; 193(1): 327-334.
- 30 50. Pfeiffer D. et al. miR-146a, miR-146b, and miR-155 increase expression of IL-6 and IL-8 and support HSP10 in an In vitro sepsis model. *PLOS ONE* 29 de junio de 2017
51. Gao et al, MicroRNA-146 regulates the inflammatory cytokines expression in vascular endothelial cells during sepsis. *Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, volumen 72, número 11, noviembre de 2017, pp. 700-704(5)

REIVINDICACIONES

1. Composición farmacéutica que contiene un ARN bicatenario mímico de miR-27a-5p para su uso en la prevención o reducción de lesiones intestinales en un sujeto que padece una infección por *Clostridium Difficile*.
- 5 2. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que dicho ARN mímico de miR-27a-5p tiene una secuencia de nucleótidos similar en más de un 70% a la SEQ ID NO:1.
3. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en la que dicho ARN mímico de miR-27a-5p tiene la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:1.
4. Composición farmacéutica para uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 5. Composición farmacéutica para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho ARN mímico de miR-27a-5p está asociado o incluido en un vector, matriz o partículas que promueven su estabilidad y/o su transfección.
- 15 6. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 5, en la que dicho vector se selecciona de entre: adenovirus, retrovirus, lentivirus, virus adenoasociados (AAV), virus del herpes, citomegalovirus (CMV) y vaccinia virus.
7. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 5, en la que dichas partículas se seleccionan entre: liposomas (DOPC), nanopartículas lipídicas, nanocélulas, nanopartículas de sílice, exosomas.
8. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 5, en la que dicha matriz se selecciona entre emulsión lipídica neutra (NLE), polietilenimina (PEI), poli(lactida-co-glicolida) (PLGA).
- 20 9. Composición farmacéutica para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho ARN mímico de miR-27a-5p se conjuga con una molécula química seleccionada entre: lípidos, colesterol, PEG, ciclodextrina, quitosano, dendrímeros (de poli(amidoamina) o de poli(propilenimina), N-acetil-D-galactosamina (GalNAc).
10. Composición farmacéutica para uso según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizada porque** se administra a dicho sujeto por vía intravenosa.

FIG. 1A

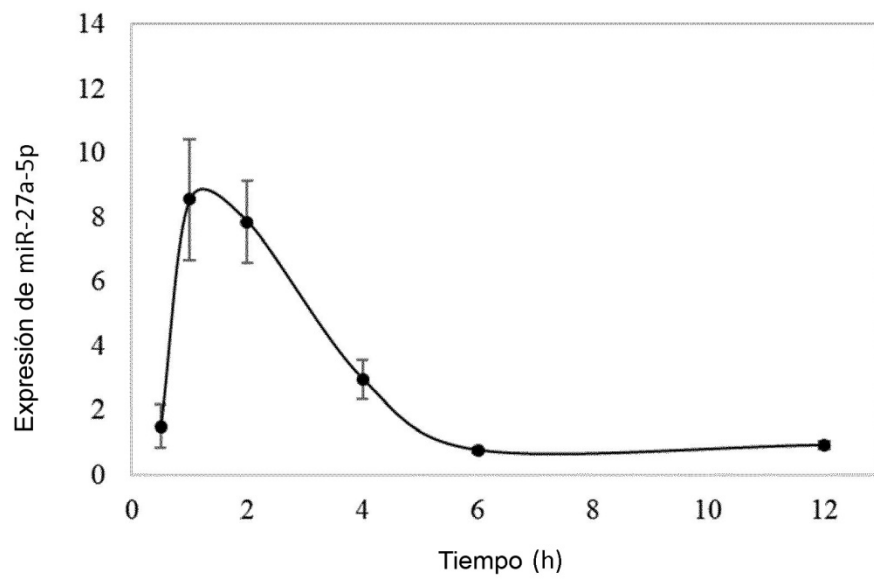


FIG. 1B

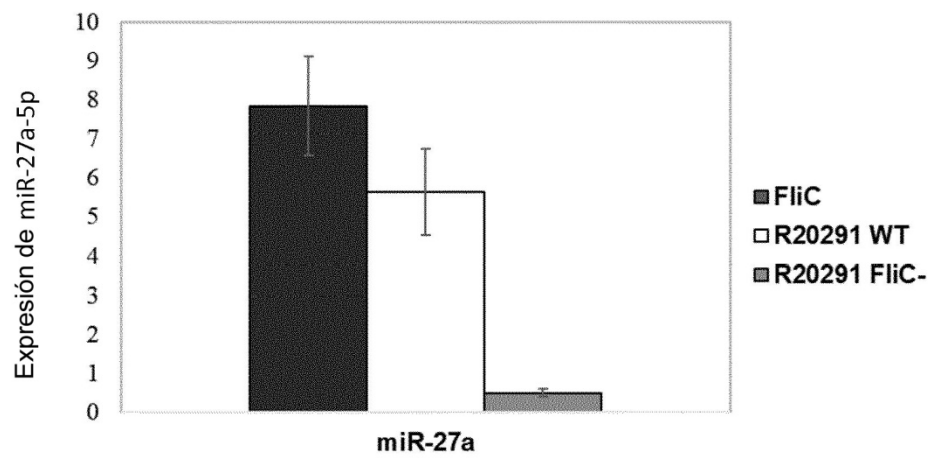


FIG. 2A

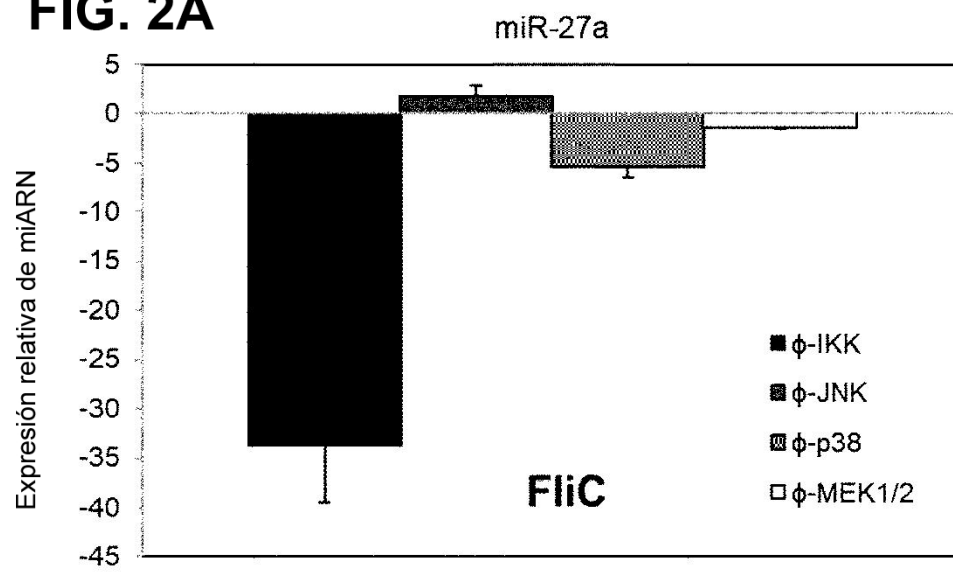


FIG. 2B

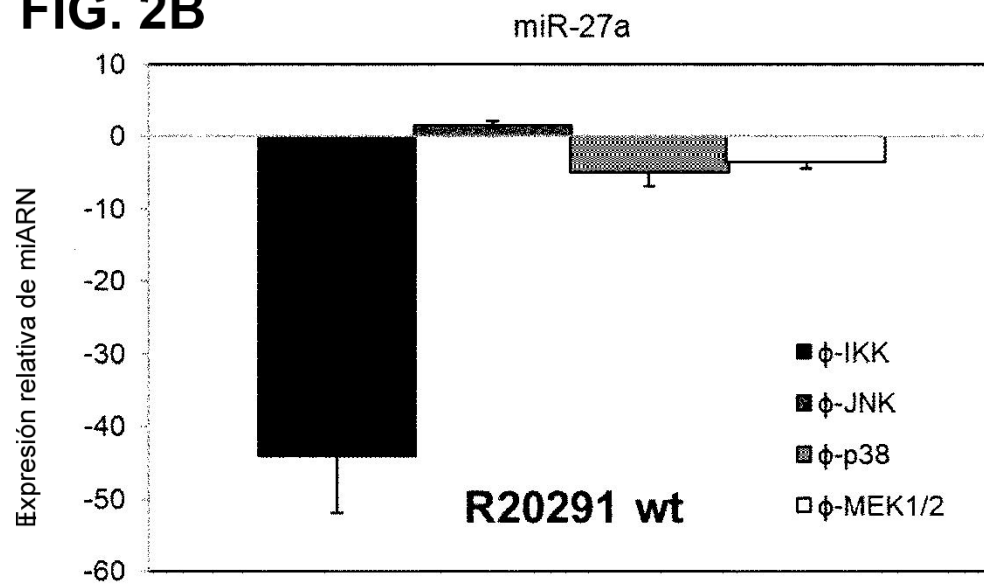


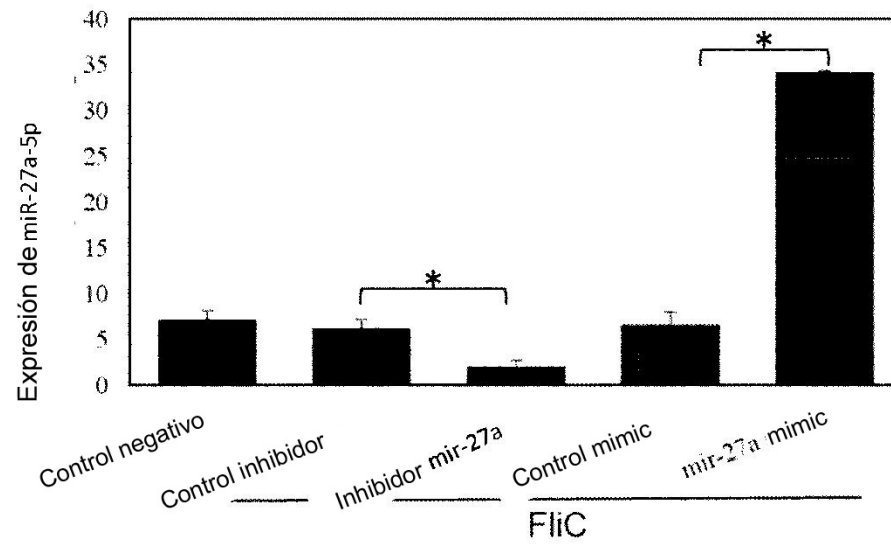
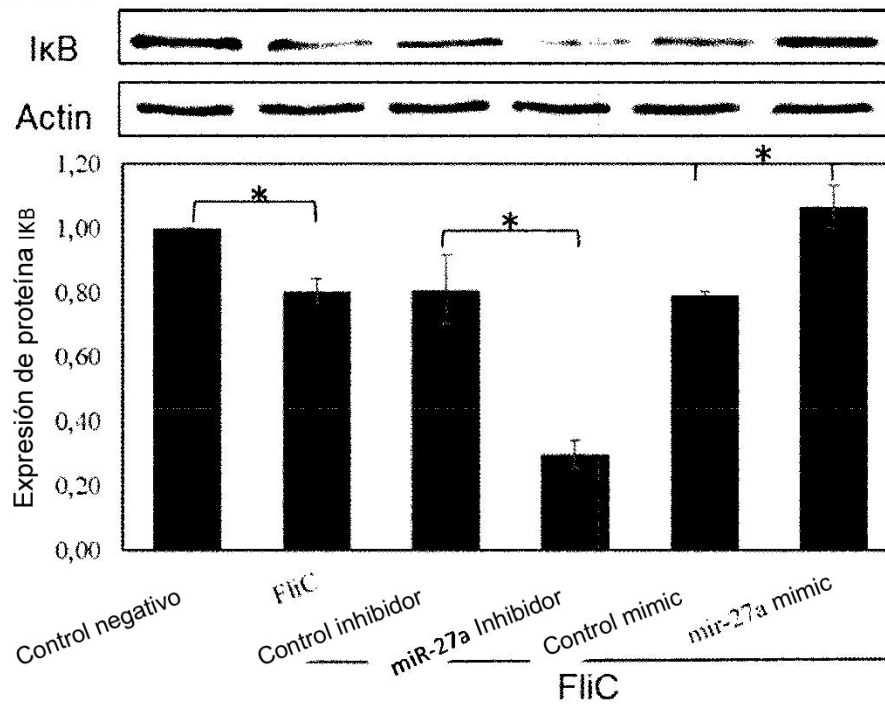
FIG. 3A**FIG. 3B**

FIG. 3C

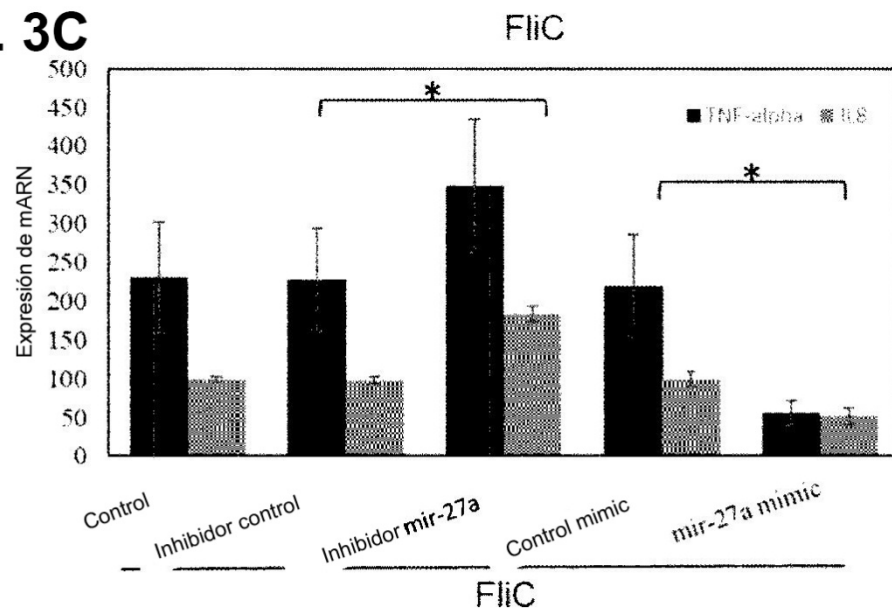


FIG. 3D

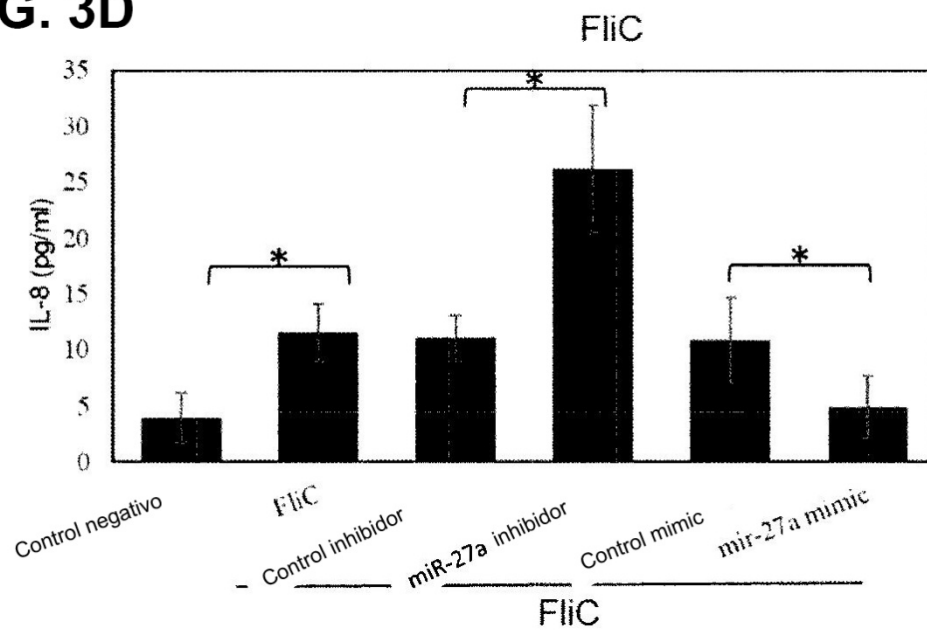


FIG. 4A

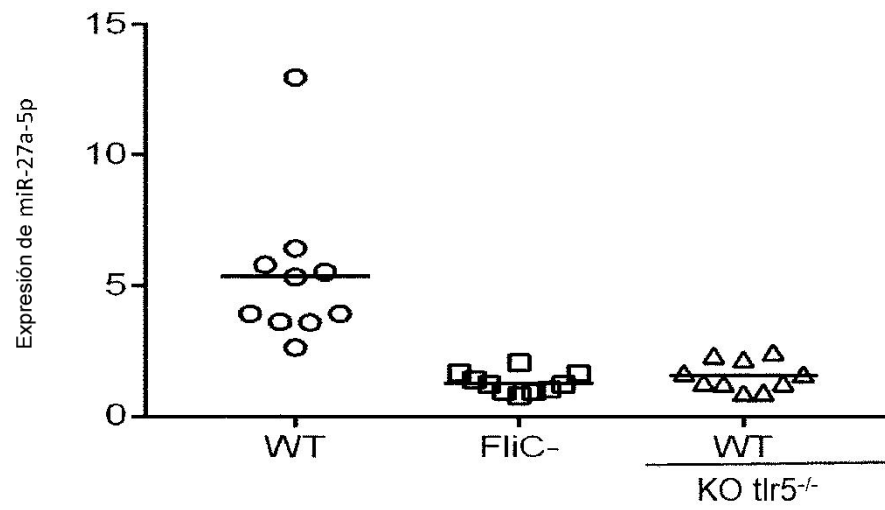
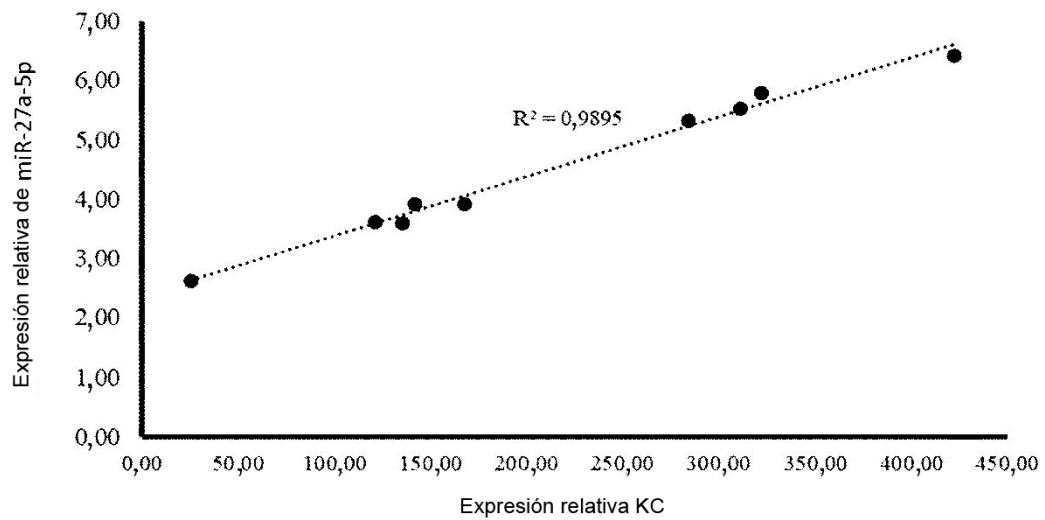


FIG. 4B



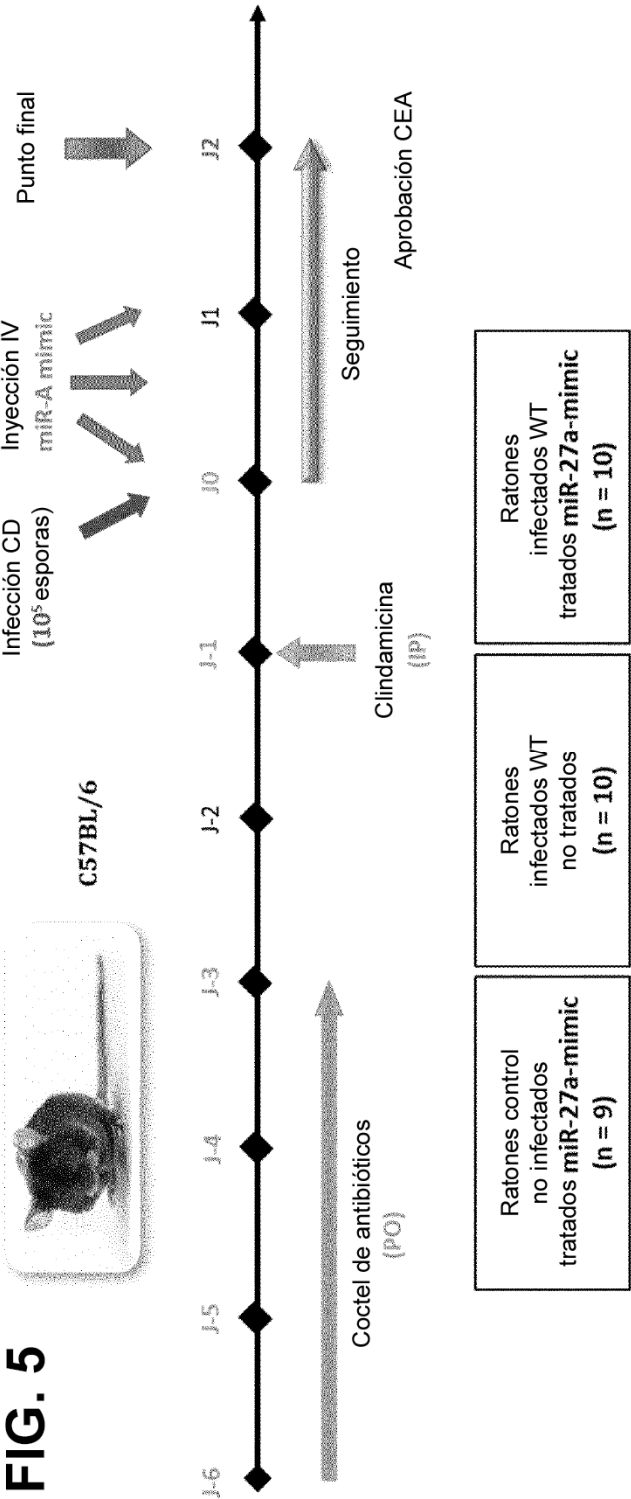


FIG. 6A

Control

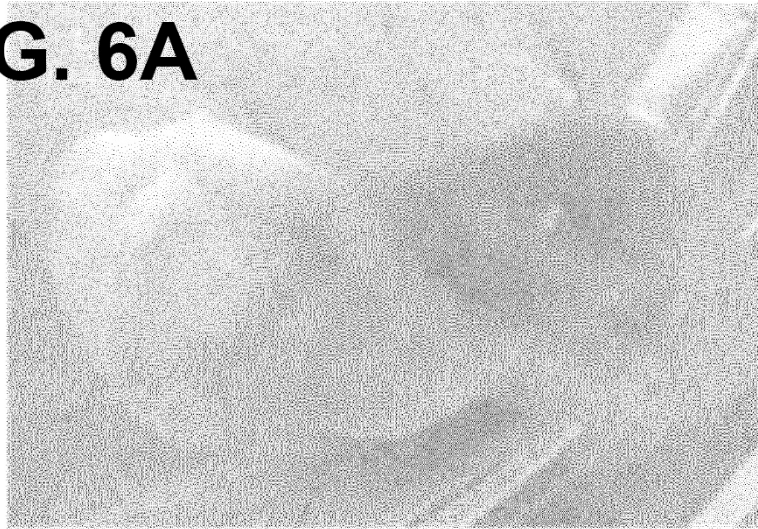


FIG. 6B

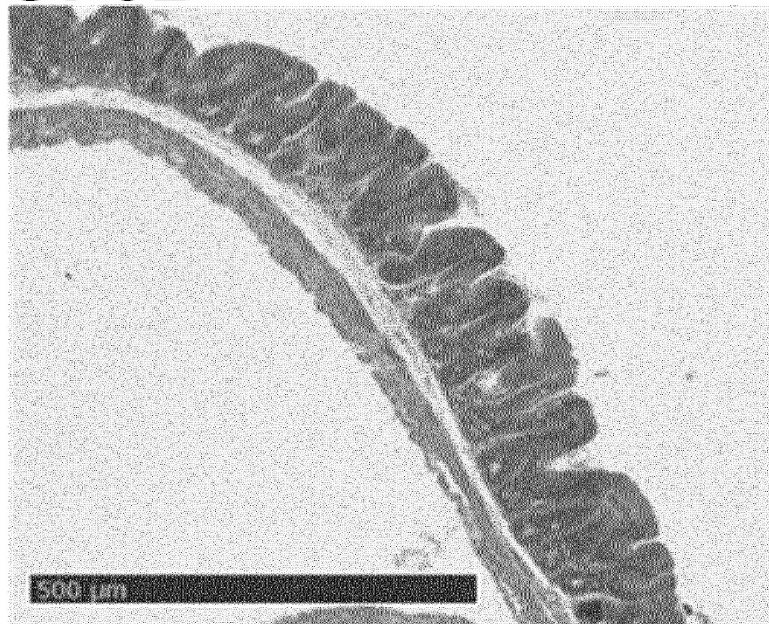


FIG. 6C

WT

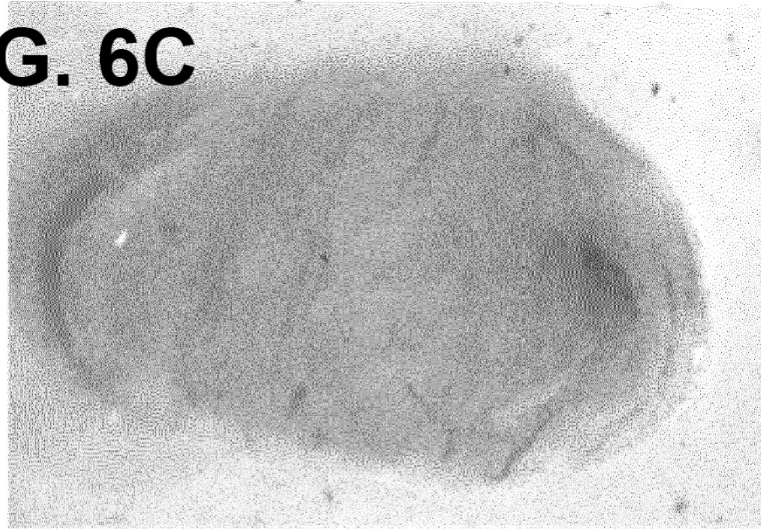
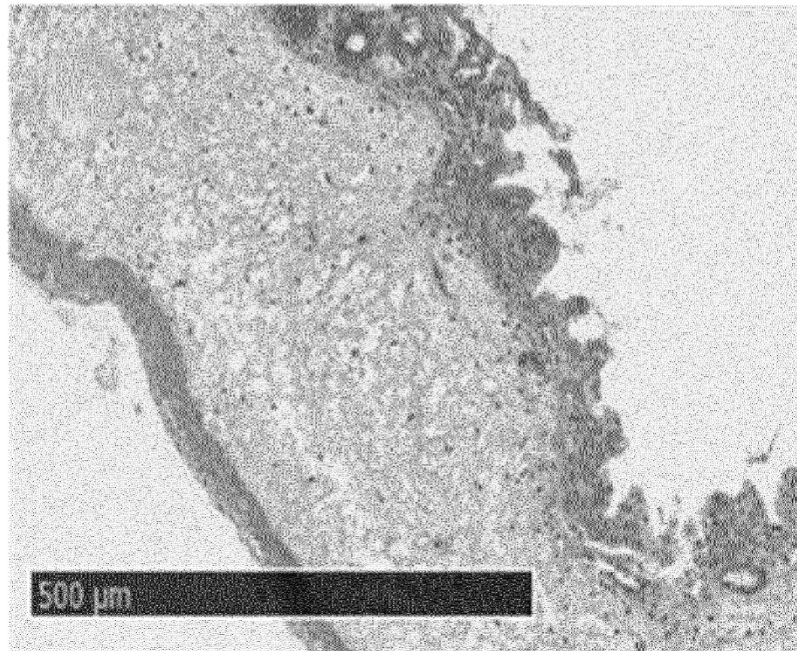


FIG. 6D



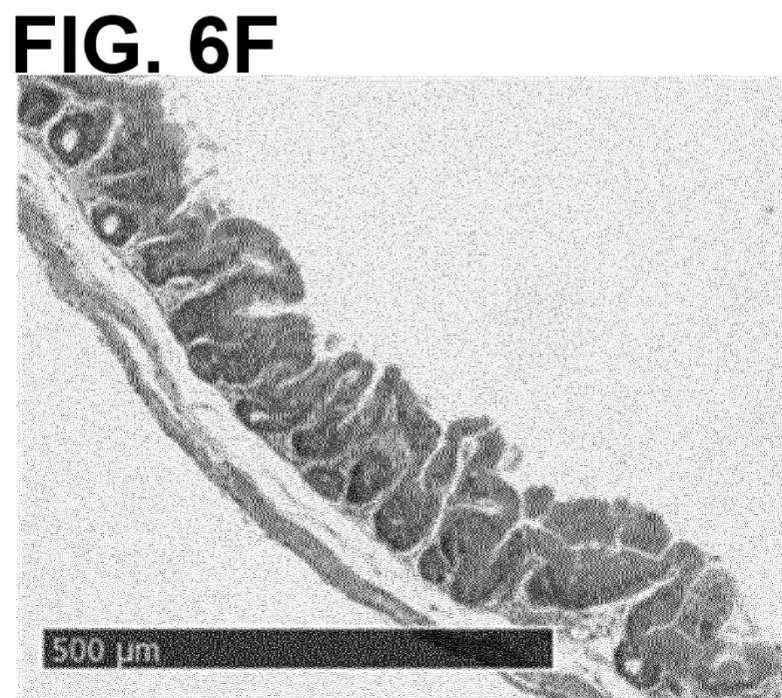
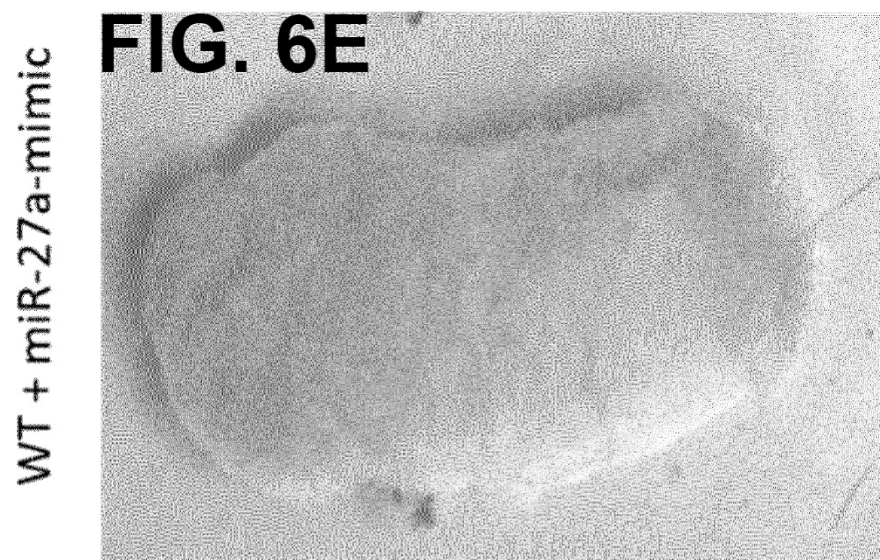


FIG. 6G

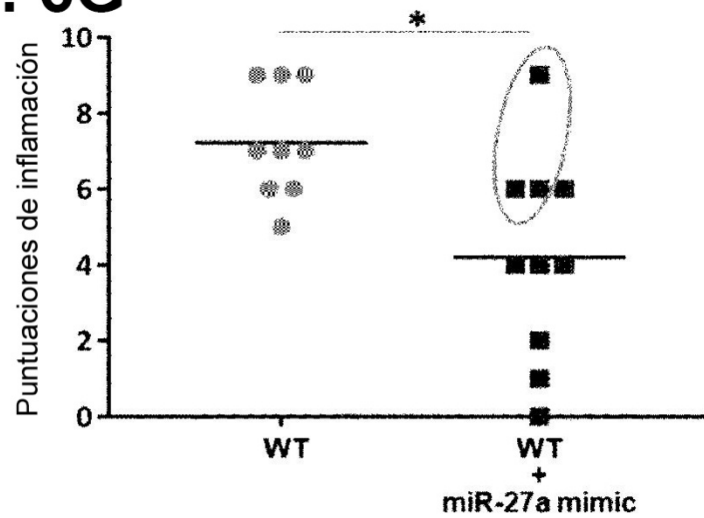


FIG. 6H

