

---

## Regulación de la expresión génica: el rol de los microARNs

Prof. Teresa Rodríguez y Dra. Joaquina Farías

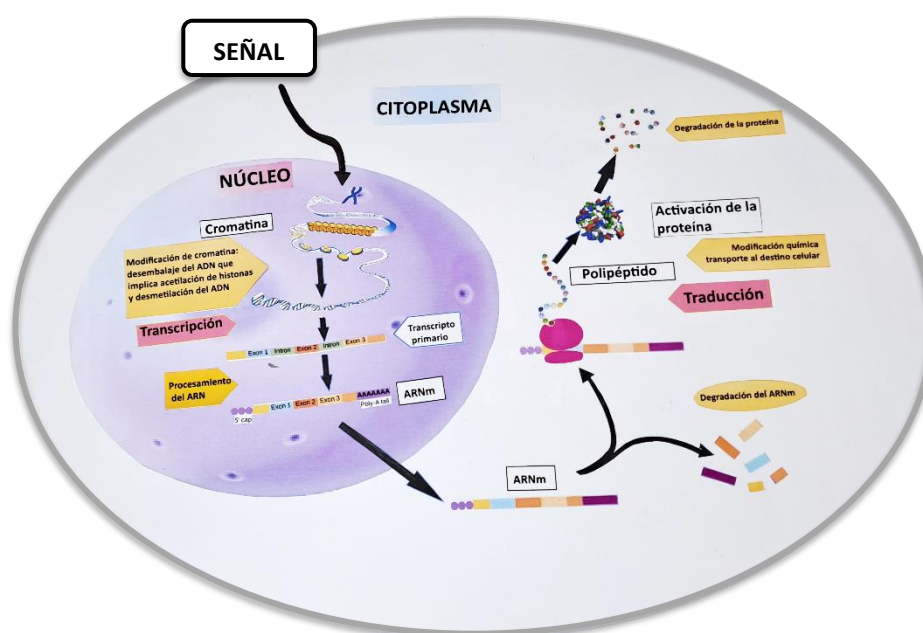
Material generado en el marco de  
pasantías Ciencia Joven 2023

ANEP-PEDECIBA

El ADN de un organismo contiene la información necesaria para producir todos los ARNs y proteínas que componen a sus células. Esta información está almacenada en estructuras denominadas genes. La expresión génica es el proceso a través del cual la información codificada en un gen permite generar un producto final que puede variar dependiendo de la naturaleza del gen. En el caso de los genes codificantes, el producto final es una proteína, que se origina a través de dos procesos consecutivos, la transcripción (generando una molécula de ARN mensajero, ARNm) y la traducción (generando un polipéptido). En el caso de los genes no codificantes, el producto final es una molécula de ARN. Son ejemplos de genes no codificantes aquellos que dan lugar a los ARNs ribosomales (ARNr), los ARNs de transferencia (ARNt) y los ARNs reguladores (como los ARNs no codificantes largos, los micro ARNs (microARNs), entre otros).

La regulación de la expresión génica determina cuándo, dónde y en qué cantidad se genera el producto final de un gen. Este proceso está muy finamente regulado y es el que le permite a las células adaptarse a entornos variables, pudiendo responder a diferentes estímulos. Los mecanismos de regulación le otorgan a las células control sobre sus diferentes estructuras y funciones, y son la base de la diferenciación celular. A su vez, debido al elevado costo de la síntesis proteica, la regulación de la expresión génica es un proceso esencial para conseguir una utilización óptima de la energía disponible. Las células eucariotas poseen varios niveles de regulación de la expresión génica (**Figura 1**), pudiendo regular cada uno de los pasos que existen entre el ADN y el producto final del gen (ARN o proteína). De esta manera, una célula puede regular los niveles de producto final de un gen controlando cuándo y con qué frecuencia se transcribe el gen (control transcripcional), cómo se procesa el transcrito generado (control del procesamiento del ARN), si el transcrito es exportado del núcleo y dónde será localizado en el citoplasma (control del transporte y localización del ARN), si el transcrito es traducido por los ribosomas y a qué niveles (control traduccional), la estabilidad de los ARN en el citoplasma (control de la degradación del ARN), o

activando, inactivando, degradando o localizando las proteínas producidas (control post-traduccional).



**Figura 1. Niveles de regulación de la expresión génica.** La regulación de la expresión de un gen se puede dar en cada uno de los pasos que existen desde el gen (ADN) hasta el producto final (ARN o proteína).

Gracias a los avances en las técnicas de biología molecular, en las últimas décadas se han obtenido valiosos conocimientos sobre los mecanismos implicados en los diferentes niveles de regulación de la expresión génica. Particularmente, se describirán aquellos implicados en la regulación a nivel post-transcripcional, debido a sus implicancias en el desarrollo de enfermedades, así como el uso de este conocimiento en tratamientos terapéuticos, entre otras potenciales aplicaciones.

### Regulación a nivel post-transcripcional

La transcripción de un gen codificante produce una molécula denominada ARNm primario (pre-ARNm), la cual experimenta una serie de modificaciones para dar lugar a la molécula de ARNm madura, que es posteriormente transportada y localizada en el citoplasma para su traducción. Todos estos pasos están perfectamente controlados y constituyen un nivel de regulación de la expresión génica denominado regulación post-transcripcional. Algunas de estas modificaciones consisten básicamente en dos

procesos: la eliminación de los intrones (mediante el proceso de corte y empalme), y la adición de modificaciones al ARNm, como la incorporación de un nucleótido modificado en el extremo 5' (5'cap) y la adición de una cadena de varias adeninas en el extremo 3' (cola poliA), dando lugar así a la cadena de ARNm madura.

A continuación, se profundizará en dos mecanismos de regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional, estos son: el empalme alternativo y la regulación mediada por microRNAs.

### Empalme alternativo

La maduración de los ARNs implica la eliminación de los intrones -secuencias no codificantes- y la unión de los exones -secuencias codificantes. Este proceso se denomina corte y empalme (o *splicing* en inglés), y es característico de los genes de organismos eucariotas. Para ciertos genes, existe una variación de este proceso, denominado empalme alternativo, que permite obtener a partir de un pre-ARNm distintas isoformas de ARNm y proteínas, cuyas estructuras y funciones pueden variar. El empalme alternativo suele ser específico de cada célula, de modo que una proteína se puede ajustar para funcionar en un tipo de célula particular. Al mismo tiempo, este sistema permite almacenar la información de forma más económica. Podríamos decir que a partir del descubrimiento de este mecanismo, se invalida la teoría “un gen, una proteína” (originalmente “un gen, una enzima”, teoría propuesta por George Beadle y Edward Tatum en la década de 1940), ya que un mismo gen puede dar lugar a varios polipéptidos diferentes.

### ARNs reguladores pequeños: microARNs

Una vez que el ARNm maduro es transportado hacia el citoplasma, puede o no ser traducido para generar proteína. La ocurrencia de la traducción y la cantidad de proteína sintetizada va a estar determinada por el tiempo que el ARNm esté disponible en el citoplasma para su traducción y qué tan fácilmente puede unirse a él la maquinaria traduccional. Es aquí donde entran en juego otros mecanismos de regulación de la expresión génica a nivel post-transcripcional, entre los que se encuentran aquellos mediados por moléculas de ARNs pequeñas denominadas microARNs. Los microARNs regulan el procesamiento post-transcripcional del ARN

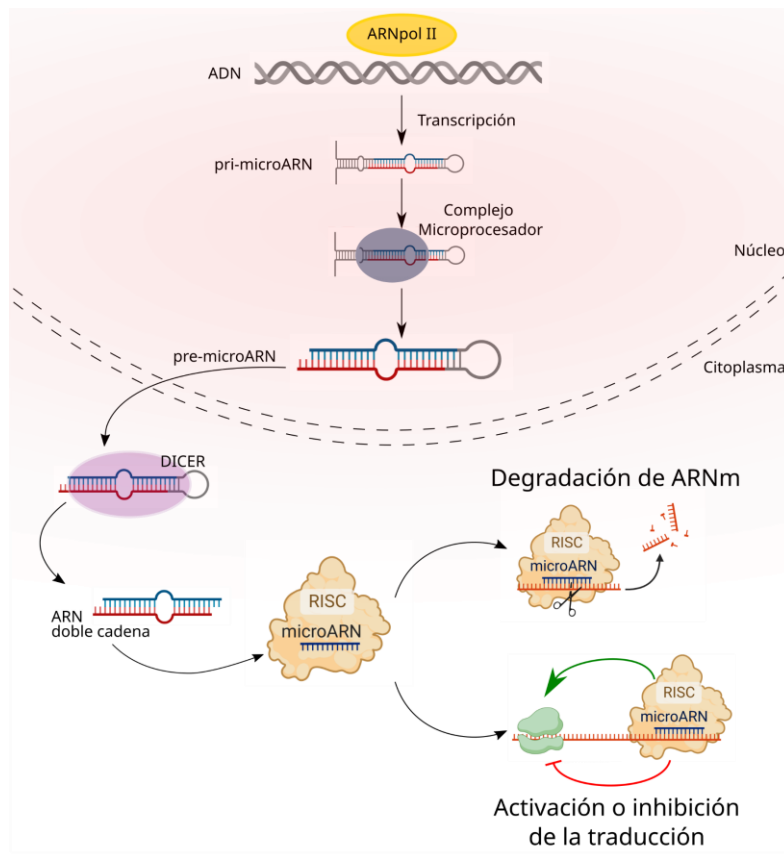
mediante el apareamiento de bases con un ARNm complementario (ARNm blanco), conduciendo a la represión o activación de la traducción, o la degradación del ARNm.

Los microARNs son moléculas de ARN de típicamente 21 a 24 nucleótidos de longitud que no codifican proteínas. Estas moléculas fueron originalmente identificadas en 1998 en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* como reguladores de su desarrollo. Este descubrimiento les valió a los investigadores Andrew Fire y Craig Mello el Premio Nobel en Fisiología y Medicina en 2006. Actualmente, existe evidencia que los microARNs desempeñan un papel importante en la regulación de diversos procesos biológicos, como el desarrollo embrionario, la diferenciación y proliferación celular, la apoptosis y la tumorigénesis. Se han descubierto cientos de miles de genes de microARNs en animales, plantas, hongos e incluso virus, lo que sugiere un origen evolutivamente muy antiguo de los microARN y sus mecanismos reguladores.

### **Biogénesis y mecanismos de acción de los microARNs**

La vía canónica de biogénesis de los microARNs se presenta en la **Figura 2**. En esta vía, los microARNs son transcritos en el núcleo por la ARN polimerasa II, formando un transcrito primario denominado pri-microARN, que luego es procesado por el complejo Microprocesador, generando el pre-microARN. Este ARN tiene una estructura secundaria de horquilla, que le permite ser reconocido y exportado al citoplasma. Una vez en el citoplasma, el pre-microARN es reconocido por el complejo DICER, que lo procesa generando un ARN de doble cadena. Una de las cadenas del ARN doble cadena (la antisentido) se une al complejo silenciador inducido por ARN (RISC, del inglés *RNA-induced silencing complex*), activándolo. El reconocimiento del ARNm blanco por el complejo RISC ocurre por un apareamiento de tipo Watson-Crick entre el microARN y el ARNm.

Como se mencionó previamente, la regulación post-transcripcional de la expresión génica mediante microARNs puede producir la degradación del ARNm blanco, así como la inhibición o activación de su traducción (**Figura 2**). El mecanismo propuesto



**Figura 2. Biogénesis y mecanismos de acción de los microARNs.** Imagen creada parcialmente en Biorender.com

para la degradación de los ARNm blanco implica que luego del reconocimiento del ARNm por el complejo RISC (guiado por el microARN), se elimine la caperuza (en el extremo 5') y la cola poliA (en extremo 3'), dejando al ARNm expuesto a exo y endonucleasas. En cuanto a la represión de la traducción de los ARNm blanco, se propone que algunos de los componentes del complejo RISC (como la proteína AGO) interactúen con diversos factores que determinan el inicio de la traducción (como el factor eIF4E y los factores PABP -proteínas de unión a la cola poliA). Asimismo, la unión del complejo RISC con el ARNm blanco puede interferir con los factores de elongación de la traducción, llevando a la disociación de las subunidades ribosomales, produciendo la terminación prematura de la traducción. Los mecanismos de acción de los microARNs más conocidos y estudiados están vinculados a la baja en la expresión génica de los ARNm blancos, mediante la degradación del ARNm o la inhibición de la traducción. Sin embargo, ciertos estudios indican que los microARNs pueden también inducir la expresión de sus blancos, en este caso, promoviendo la unión de factores de traducción específicos.

## **Rol de los microARNs**

Desde el descubrimiento de los microARNs en la década de 1990, se han logrado enormes avances en cómo se producen los microARNs dentro de las células, cómo ejercen efectos reguladores sobre la expresión génica y cómo participan en diversos eventos fisiológicos y patológicos. Se han identificado microARNs que participan en el desarrollo, tanto de animales como vegetales, en la diferenciación celular, así como en mecanismos de protección frente a patógenos.

A modo de ejemplo, se considera que los microARNs son reguladores clave de muchos procesos de desarrollo, homeostáticos e inmunitarios en las plantas. Sus funciones en el desarrollo de las plantas incluyen el desarrollo del meristema apical de los brotes, el crecimiento de las hojas, la formación de flores, la producción de semillas o la expansión de las raíces. Además, desempeñan un papel relevante en la respuesta a diversos tipos de estrés abiótico, como estrés por calor, bajas temperaturas y sequía, entre otros. Por otro lado, se ha reportado que varios microARNs cambian su expresión cuando la planta es infectada por un patógeno. Diversas investigaciones demostraron que los microARNs pueden funcionar como moduladores de las respuestas inmunitarias de las plantas, regulando la expresión de genes que codifican factores de defensa.

Respecto al rol de los microARNs en animales, se tiene evidencia que participan en la diferenciación celular y tisular, así como regulando el desarrollo de los organismos. Más allá de las implicancias de los microARNs en el funcionamiento normal de las células, se ha asociado la desregulación de los microARNs con el desarrollo de diversas patologías humanas, como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas y enfermedades metabólicas. Dada la importancia de los microARNs en los procesos patológicos, tienen un gran potencial como blancos terapéuticos y nuevos biomarcadores, tanto de diagnóstico como de pronóstico de enfermedades. Por ejemplo, diversas investigaciones actuales centran sus estudios en la manipulación de la actividad y biogénesis de los microARNs como estrategia para el desarrollo de terapias eficaces contra el cáncer.

## **Proyecto de investigación: Identificación de microARNs involucrados en la respuesta al estrés por frío en *Eucalyptus grandis***

En las últimas décadas, numerosas investigaciones, llevadas a cabo tanto por científicos internacionales como nacionales, se han centrado en describir el rol de los microARNs en diversos modelos biológicos y condiciones de estudio. En este punto nos gustaría presentarles un proyecto que se está llevando a cabo en la sede Tacuarembó del CENUR Noreste de la UdelaR, titulado “Identificación de ARNs pequeños involucrados en la respuesta al estrés por frío en *Eucalyptus grandis*” (Responsable: Joaquina Farías; Financiación: Fondo Vaz Ferreira 2021). Este proyecto tiene como objetivo identificar los microARNs que varían sus niveles de expresión cuando se someten plantines de *Eucalyptus* a cambios bruscos de temperatura. A su vez, también se busca identificar los ARNm blancos de estos microARNs, de manera de conocer los genes que estos regulan.

### Fundamentación del proyecto

Los eucaliptos son los árboles más plantados a nivel mundial debido a su creciente importancia para la producción de fibra y energía. Uno de los factores abióticos que más condiciona el crecimiento de estos árboles son las temperaturas mínimas, pues temperaturas mínimas muy bajas generan daños importantes, pudiendo matar parte o la totalidad del árbol en una sola ocurrencia. Se ha documentado que los mayores daños por frío para las especies forestales se dan en los primeros dos años luego de la siembra, ya que la temperatura a nivel del suelo suele ser más baja que a unos metros por encima de él. Otra causa frecuente de daños graves es un descenso muy repentino de la temperatura. Si bien en Uruguay no existen temperaturas bajo cero durante períodos prolongados, se registran entre 20 y 35 heladas anuales, siendo en algunos casos muy severas.

El estrés por frío afecta considerablemente la fisiología de la planta y desencadena una respuesta bioquímica característica. En respuesta al frío, muchas sustancias y proteínas protectoras son sintetizadas, participando en la regulación del potencial osmótico, la formación de cristales de hielo, la estabilidad de las membranas y la

eliminación de especies reactivas de oxígeno. También se induce la expresión de varios factores de transcripción, regulando genes relacionados a la respuesta a este estrés.

En los últimos años y de manera creciente, se ha apuntado al papel de los microARNs para entender la reprogramación de la expresión génica frente a distintos tipos de estrés, entre ellos el estrés por frío. A pesar del consenso respecto a la relevancia de los microARNs en la regulación de la expresión génica en vegetales y de la gran importancia que poseen los *Eucalyptus* para la industria forestal a nivel mundial, la información que existe sobre los microARNs en *Eucalyptus* continúa siendo muy escasa.

En este trabajo de investigación, se estudió la respuesta de los microARNs y ARNm al estrés por frío en hojas de plantines de *E. grandis*, una de las especies de eucalipto más plantadas en Uruguay.

### Materiales y métodos

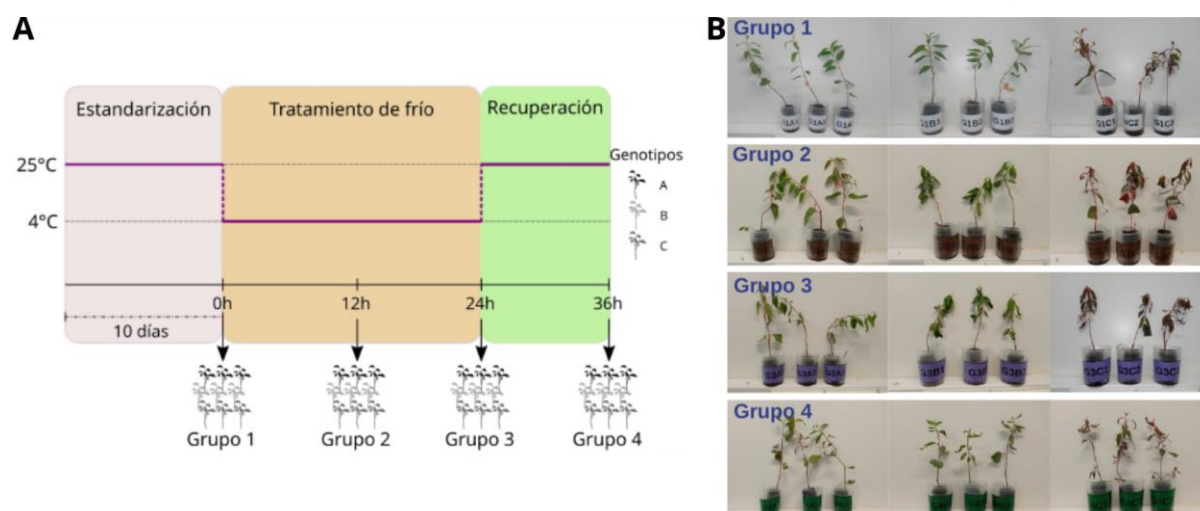
Dado que las plantas jóvenes son las más susceptibles a los daños por frío, se sometieron plantines de *E. grandis* de 20 cm (proveídos por una empresa forestal del territorio) a un shock térmico (de 25°C a 4°C) durante 24 horas, seguido de una fase de recuperación de 12 horas a 25°C (**Figura 3**). Durante el tratamiento se colectaron muestras de hojas de cada planta para los análisis de parámetros fisiológicos y moleculares. Con el objetivo de identificar aquellos microARNs que estén regulando los cambios de expresión génica en respuesta al estrés por frío, se realizó la extracción de ARN total (incluyendo tanto los ARNm como los microARNs) y la secuenciación masiva de ambos grupos de ARNs. Una vez obtenidos los datos de secuenciación masiva, los mismos fueron analizados por diferentes algoritmos bioinformáticos para identificar aquellos microARNs que cambien su expresión con el tratamiento de frío, e identificar sus posibles ARNm blancos.

### Resultados y discusión

El tratamiento de frío se evaluó midiendo algunos parámetros fisiológicos para los cuales ya fue reportada su afectación cuando las plantas se someten a un estrés por



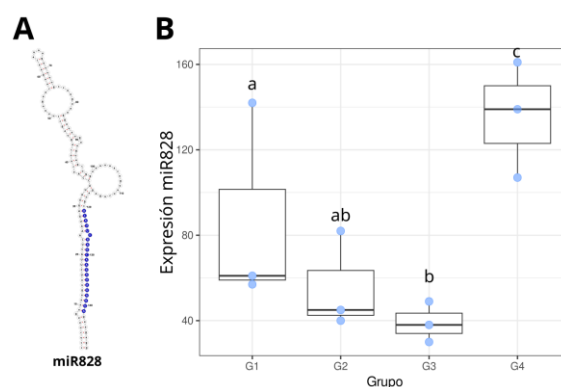
bajas temperaturas. Por ejemplo, está reportado que el estrés por frío a menudo daña las membranas celulares, y un parámetro utilizado para estimar la integridad



**Figura 3. Tratamiento de frío realizado a plantines de *Eucalyptus grandis*.** **A.** Esquema del tratamiento de frío realizado. El tratamiento se efectuó en el laboratorio, utilizando una cámara de crecimiento. **B.** Fotografías de los plantines al momento de sacarlos de la cámara de crecimiento donde se realizó el tratamiento. Grupo 1: 0 hs a 4°C (control), Grupo 2: 12 hs a 4°C, Grupo 3: 24 hs a 4°C, Grupo 4: 24 hs a 4°C + 12 hs a 25°C.

de las mismas es la fuga relativa de electrolitos. Midiendo el parámetro de fuga de electrolitos se pudo evidenciar que el tratamiento produjo daño de las membranas luego de 12 horas a 4°C, incrementándose el parámetro a las 24 horas del tratamiento de frío. También se observó que las membranas se recuperaron parcialmente luego de 12 horas a 25°C.

En cuanto al análisis de los datos de los microARNs es importante mencionar que los mismos no están debidamente reportados en el genoma de *E. grandis*, por lo que el primer paso del análisis bioinformático se centró en la identificación de los genes que dan lugar a los microARNs. Mediante este análisis se logró identificar más de mil microARNs en el genoma de *E. grandis*, varios de ellos conservados en otras especies de plantas. Posteriormente, se buscó determinar qué microARNs cambian su expresión cuando se somete a las plantas a un estrés por frío. Entre ellos nos gustaría destacar al miR828 (**Figura 4A**). Luego del tratamiento de frío, la expresión de este microARN disminuyó de manera estadísticamente significativa (**Figura 4B**).



**Figura 4. Estructura y expresión del microARN miR828.** A. Estructura secundaria del pre-miR828 de *Eucalyptus grandis*. Se destaca en color azul la secuencia que dará lugar al microARN. B. Gráfico de cajas de valores de expresión del miR828 durante el tratamiento de frío. Letras diferentes indican diferencia estadísticamente significativa. G1: 0 hs a 4°C (control), G2: 12 hs a 4°C, G3: 24 hs a 4°C, G4: 24 hs a 4°C + 12 hs a 25°C.

Según varios estudios, este microARN reprime la expresión de antocianinas, pigmentos pertenecientes a la familia de flavonoides (un tipo de metabolito secundario) de las plantas. Las antocianinas tienen diversas funciones, entre ellas, la protección contra diversos estreses bióticos y abióticos. Por ejemplo, está descrito que al someter plantas a un estrés por bajas temperaturas, la expresión de genes relacionados con la síntesis de antocianinas aumenta significativamente, aumentando de esta manera la acumulación de antocianinas, mejorando la tolerancia de las plantas a las bajas temperaturas. A su vez, se propuso que en plantas leñosas la acumulación de antocianinas en las hojas jóvenes durante el invierno puede reducir el daño oxidativo y aumentar las tasas fotosintéticas. De esta manera, al disminuir los niveles de miR828 con el tratamiento de frío, se podría estar regulando al alza los niveles de algún ARNm que participe en la vía de producción de antocianinas. Se plantea en el futuro cercano identificar los blancos del miR828 en *E. grandis*, estudiar el perfil de expresión de los mismos, así como medir los niveles de antocianinas durante el tratamiento de frío.

Los resultados de este proyecto permitieron caracterizar la respuesta al frío en *E. grandis* mediada por microARNs. Por otro lado, estos datos podrán ser potencialmente utilizados por programas de selección y mejoramiento de la especie, en busca de seleccionar aquellos clones más tolerantes al estrés por frío.

## Bibliografía

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. 2015. *Molecular Biology of the Cell*. 6ta Edición, Garland Science, Taylor and Francis Group, Nueva York, Estados Unidos.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-11.

Leitão AL, Enguita FJ. 2022. A Structural View of miRNA Biogenesis and Function. *Non-Coding RNA*, 8(1): 10. doi: 10.3390/ncrna8010010

Pierce BA. 2016. *Genética: un enfoque conceptual*. 5ta Edición. Editorial Médica Panamericana, Madrid, España.

Rico-Rosillo MG, Vega-Robledo GB, Oliva-Rico D. 2014. Importancia de los microARN en el diagnóstico y desarrollo de enfermedades. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* 52(3):302-7

Ruiz Esparza Garrido R, Velázquez-Flores MA. 2016. Nuevos e inesperados mecanismos de biogénesis y acción de los microRNAs. *Revista de Educación Bioquímica (REB)* 35(3): 55-70.