



Terra viridis 24. Fruto, hilo, tinta y pigmento sobre papel, 25 x 25 x 5 cm, 2010

Los miR, moléculas con grandes potenciales

◆ Verónica Narváez Padilla

Una molécula de ARN (ácido ribonucleico), las cuales ni siquiera se conocían hace dos décadas, están de moda actualmente entre la comunidad científica, debido a las expectativas que se tienen de que puedan funcionar como agentes terapéuticos para una amplia variedad de enfermedades. Para entender qué son y cómo funcionan estas moléculas, conocidas como miR o microARN, debo explicar a grandes rasgos la estructura y función del ADN (ácido desoxirribonucleico) y el ARN mensajero.

El ADN se compone de dos cadenas muy largas de cuatro tipos de unidades llamadas nucleótidos (A, C, G y T), y es la molécula que contiene las instrucciones genéticas que dictan el desarrollo y funcionamiento de los seres vivos. Los nucleótidos se aparean siempre de la misma forma: A con T y C con G, para formar las dos cadenas del ADN, lo que se conoce como complementariedad. De esta forma, aun teniendo solo una cadena del ADN se puede deducir fácilmente la secuencia de la otra. Por ejemplo, si la secuencia en una de las cadenas de ADN es ATG CGC ACG, la secuencia de la cadena complementaria es TAC GCG TGC.

Las instrucciones genéticas dentro del ADN están dadas por la secuencia de los nucleótidos, lo que determina qué proteínas se forman. Una proteína es una cadena de aminoácidos. Para poder convertir la información genética en proteínas se

requiere de dos fenómenos: la transcripción y la traducción. La transcripción consiste en hacer una copia de ARN de una región del ADN (un gen) utilizando una de sus dos cadenas.

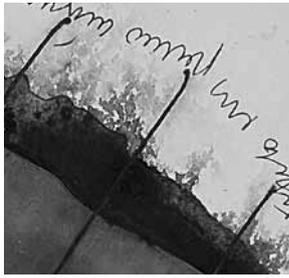
Este ARN, conocido como “mensajero”, es similar al ADN, pero se constituye solo de una cadena. Se sintetiza en el núcleo de la célula (que es donde se localiza el ADN) y viaja al citoplasma, donde se encuentran los ribosomas, moléculas en las que se lleva a cabo la traducción y síntesis de proteínas.

La traducción, por su parte, consiste en tomar la información del ARN mensajero y transformarla en proteínas. Para esto se requiere el código genético, el cual utiliza tres letras para codificar un aminoácido. Las proteínas son cadenas largas de aminoácidos. Por ejemplo, la secuencia ATG CGC ACG es convertida en los aminoácidos metionina, arginina y treonina, respectivamente. De esta forma, por medio de la transcripción y la traducción se expresan los genes codificados en el ADN.

Dado que todas las células de un organismo tienen el mismo ADN (con la misma secuencia), todas ellas son capaces de crear las mismas proteínas; sin embargo, cada tipo celular produce un conjunto diferente de ellas, y esto es lo que las distingue y les da su función. Lo anterior se logra mediante la regulación diferencial de la expresión genética, con mecanismos que determinan qué genes se expresan en qué célula, cuándo y en qué nivel. Las



◆ Profesora e investigadora, Facultad de Ciencias, UAEM



moléculas que se encargan de regular los niveles y los tiempos de expresión de cada gen se conocen como factores de transcripción, y en general son proteínas que reconocen ciertas secuencias en el ADN y permiten que se sintetice el ARN mensajero, controlando cuándo y cuántas copias se deben hacer, lo que a su vez repercute en los tipos y niveles de proteína que cada célula produce.

Hasta hace menos de quince años, toda la investigación en relación con la regulación de la expresión genética se centraba en el estudio de los factores de transcripción, y el ARN que más se estudiaba era el ARN mensajero, por ser el que codifica la información para hacer las proteínas. En 1993 se encontró en el nemátodo *C. elegans* un ARN de veintinueve nucleótidos, muy pequeño en comparación con las moléculas de ARN mensajero, que tienen cientos o miles de nucleótidos.¹ Este ARN no codificaba para ninguna proteína; sin embargo, parecía intervenir en el desarrollo de la larva. Este pequeño ARN, llamado lin-4, era complementario del ARN mensajero de la proteína LIN-14, y se observó que, al aparearse con este mensajero, inhibía su traducción, al impedir el paso de los ribosomas, con lo cual disminuía la cantidad de proteína producida en la célula.

Esta fue la primera vez que se describió una función de regulación de expresión genética en una molécula de ARN; sin embargo, se pensó que esta era una peculiaridad exclusiva de *C. elegans* y no se le dio mayor importancia. Siete años después, en 2000, se encontró, también en *C. elegans*, otro ARN pequeño que funcionaba de manera similar a lin-4 (este nuevo ARN se llama let-7); pero, interesante, se encontró que let-7 no era exclusivo de *C. elegans*, ya que también estaba en muchas otras especies. Lo anterior hizo pensar que el fenómeno de inhibir la traducción por medio de pequeños ARN podría ser algo general y no exclusivo de *C. elegans*.² A estos pequeños ARN se les denominó miR o microARN.

A partir de entonces ha habido un gran avance en el estudio de los miR y su función en la regulación genética. Se han encontrado miles de ellos tanto en animales como en plantas. Se ha visto que son decisivos en la regulación de los genes y se ha documentado su participación en procesos biológicos naturales, como en el desarrollo larvario o el desarrollo neuronal, y patológicos, como en el cáncer. Se cree que los miR podrían estar participando en la regulación de hasta un 30% de los genes en mamíferos.

¹ Rosalind C. Lee, Rhonda L. Feinbaum y Victor Ambros, "The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14", *Cell*, vol. 75, 1993, pp. 843-854.

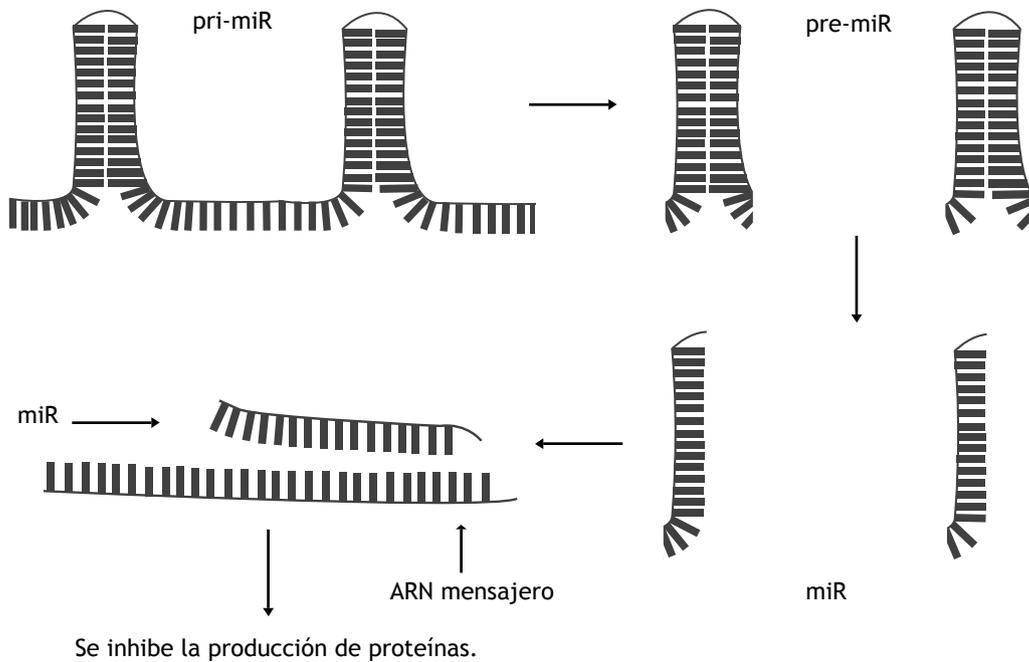
² Brenda J. Reinhart, Frank J. Slack, Michael Basson, Amy E. Pasquinelli, Jill C. Bettinger, Ann E. Rougvie, H. Robert Horvitz y Gary Ruvkun, "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*", *Nature*, vol. 403, 2000, pp. 901-906; Amy E. Pasquinelli, Brenda J. Reinhart, Frank J. Slack, Mark Q. Martindale, Mitzi I. Kuroda, Betsy Maller, David C. Hayward, Eldon E. Ball, Bernard Degnan, Peter Muller, Jurg Spring, Ashok Srinivasan, Mark Fishman, John Finnerty, Joseph Corbo, Michael Levine, Patrick Leahy, Eric Davidson y Gary Ruvkun, "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA", *Nature*, vol. 408, 2000, pp. 86-89.

Biogénesis de los miR

Los miR se forman en el núcleo de la célula a partir de un ARN precursor primario (pri-miR) de varios cientos de nucleótidos (ver figura 1). Este pri-miR se dobla formando una o varias horquillas de doble cadena de entre sesenta y cien nucleótidos. Cada una de estas horquillas se divide y así se forman los precursores de los miR (pre-miR). Estos pre-miR se transportan al citoplasma, donde una proteína (di-

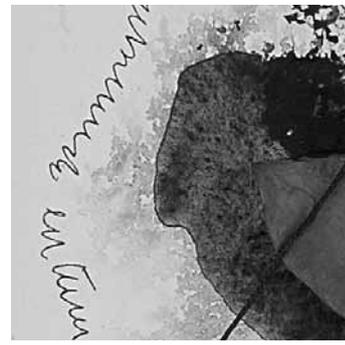
cer) los corta, creando así un ARN de doble cadena de aproximadamente veintidós nucleótidos. Una de estas cadenas se conoce como miR y la otra como miR* (microARN estrella),³ y generalmente solo una cadena es funcional y la otra se degrada. Todavía no se sabe cómo se elige la cadena funcional, aunque se cree que pueden ser varios factores, entre ellos la estabilidad termodinámica de las cadenas y la posición entre el tallo y el asa.⁴

Figura 1. Esquema de la formación de los miR en el núcleo de la célula



³ Antony Rodriguez, Sam Griffiths-Jones, Jennifer L. Ashurst y Allan Bradley, "Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units", *Genome Research*, vol. 14, 2004, pp. 1902-1910.

⁴ Jacek Krol, Krzysztof Sobczak, Urszula Wilczynska, Maria Drath, Anna Jasinska, Danuta Kaczynska y Wlodzimierz J. Krzyzosiak, "Structural features of microRNA (miRNA) precursors and their relevance to miRNA biogenesis and small interfering RNA/short hairpin RNA design", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, 2004, pp. 42230-42239; Lin Shi-Lung, Donald Chang y Shao-Yao Ying, "Asymmetry of intronic pre-miRNA structures in functional RISC assembly", *Gene*, vol. 356, 2005, pp. 32-38.



Se cree que la forma en que los miR reprimen la traducción de los ARN mensajeros es mediante dos formas, dependiendo de los niveles de complementariedad entre el miR y su blanco. Si el miR es casi 100% complementario, entonces el ARN mensajero se corta y se degrada. Sin embargo, si solo una pequeña parte es complementaria (generalmente las primeras siete bases en el extremo, conocidas como “secuencia semilla”), entonces el ARN no se degrada, sino que se bloquea la traducción por impedimento físico. Esto da un nivel más de regulación, pues el puro bloqueo de la traducción es un efecto reversible, a diferencia de la degradación del ARN mensajero.

Otra característica de los miR que aumenta su capacidad regulatoria es el hecho de que un ARN mensajero puede tener sitios múltiples de unión para varios miR, además de que un miR puede unirse en diferentes ARN mensajeros. Se ha calculado que cada miR puede regular cientos de ARN mensajeros. Estas características hacen que los miR sean muy atractivos como posibles blancos terapéuticos o como posibles fármacos blancos de drogas terapéuticas, ya que un solo miR puede afectar redes genéticas enteras, lo cual resulta particularmente interesante para el tratamiento de desórdenes complejos.

Los miR en enfermedades y su potencial terapéutico

Es creciente el número de reportes acerca de la participación de los miR en algún tipo de enfermedad o alteración metabólica, por lo que a continuación menciono solamente algunos ejemplos. En 2002 se correlacionó por primera vez la presencia de un par de miR en cáncer. Se detectó que los miR-15 y miR-16 dejan de expresarse en la mayoría de los casos de leucemia linfocítica crónica tipo B. A partir de entonces, la participación de los miR en diversos tipos de cáncer ha sido documentada ampliamente, y se ha acuñado el término “oncomir” para referirse a los miR involucrados en el cáncer. Por ejemplo, se ha clasificado al miR-21 como oncomir, ya que está sobreexpresado en una amplia variedad de cánceres (pecho, colon, páncreas, pulmón, estómago).⁵ Se demostró, en un modelo de ratón, que la sobreexpresión de miR-21 causa un fenotipo linfoide premaligno tipo B, y que, al desactivarlo, los tumores desaparecen completamente.⁶

Se han encontrado miR involucrados en enfermedades cardíacas. En 2006 se reportó que un aumento en la expresión de miR-195 en el corazón causa un crecimiento patológico y fallo cardíaco en ratones. Por otro lado, el miR-21 también participa en enfermedades de hipertrofia cardíaca. En expe-

⁵ Anna M. Krichevsky y Galina Gabriely, “miR-21: a small multi-faceted RNA”, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 13, 2009, pp. 39-53.

⁶ Pedro Medina, Mona Nolde y Frank J. Slack, “OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma”, *Nature*, vol. 467, 2010, pp. 86-90.

rimentos en un modelo de ratón que presenta una disfunción cardiaca inducida, en la que se apagó la expresión del miR-21, se observó una disminución en la disfunción cardiaca.⁷ Es interesante que este mismo miR-21 es el que participa en muchos tipos de cáncer, lo que sugiere que pudieran existir vías comunes de miR involucrados en las dos patologías.

Además de los miR que promueven tumores, también se han encontrado miR que los suprimen. Por ejemplo, la expresión de un miR de la familia de let-7 se reduce en ciertos tipos de cáncer de pulmón, y al ser sobreexpresado en células cancerosas, estas dejan de reproducirse y mueren.⁸

Se ha documentado la participación de miR en enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson y Huntington. En 2007 se reportó que, sin dicer, uno de los componentes claves en la biogénesis de miR, se da una neurodegeneración progresiva en el cerebelo.⁹ En ese mismo año se encontró que el miR-133b, el cual es importante en la maduración y el funcionamiento de las neuronas dopaminérgicas, es uno de los primeros miR que se

pierden en el tejido del cerebro medio en la enfermedad de Parkinson.¹⁰

La participación de miR en el sistema nervioso también se ha demostrado en procesos que van desde la adicción a drogas hasta la predisposición a la depresión. Por ejemplo, se encontró que el miR-212, el cual aumenta sus niveles de expresión en el estriado dorsal de ratas que han consumido cocaína por un periodo extendido de tiempo, participa en la determinación de la vulnerabilidad en la adicción a esta droga.¹¹ En relación con la depresión, se ha visto que la disrupción del ciclo circadiano es un factor que contribuye a su desarrollo, y estudios genéticos han asociado un polimorfismo en el gen del miR-182 con depresión e insomnio.¹²

En el Laboratorio de Biología del Desarrollo de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM) se estudia la participación de los miR en la susceptibilidad a nicotina. Se utiliza la mosca de fruta (*Drosophila melanogaster*) como modelo experimental, y se ha encontrado que moscas hipersensibles a la nicotina

⁷ Thomas Thum, Carina Gross, Jan Fiedler, Thomas Fischer, Stephan Kissler, Markus Bussen, Paolo Galuppo *et al.*, "MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts", *Nature*, vol. 456, 2008, pp. 980-984.

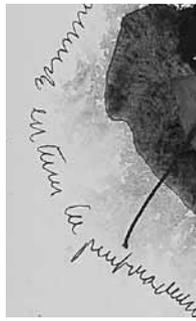
⁸ Madhu S. Kumar, Stefan J. Erkeland, Ryan E. Pester, Cindy Y. Chen, Margaret S. Ebert, Phillip A. Sharp y Tyler Jacks, "Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, 2008, pp. 3903-3908.

⁹ Anne Schaefer, Dónal O'Carroll, Chan Lek Tan, Dean Hillman, Mutsuyuki Sugimori, Rodolfo Llinas y Paul Greengard, "Cerebellar neurodegeneration in the absence of microRNAs", *The Journal of Experimental Medicine*, vol. 204, 2007, pp. 1553-1558.

¹⁰ Jongpil Kim, Keiichi Inoue, Jennifer Ishii, William B. Vanti, Sergey V. Voronov, Elizabeth Murchison, Gregory Hannon y Asa Abeliovich, "A MicroRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons", *Science*, vol. 317, 2007, pp. 1220-1224.

¹¹ Jonathan Hollander, Heh-In Im, Antonio L. Amelio, Jannet Kocerha, Purva Bali, Qun Lu, David Willoughby, Claes Wahlestedt, Michael D. Conkright y Paul J. Kenny, "Striatal microRNA controls cocaine intake through CREB signalling", *Nature*, vol. 466, 2010, pp. 197-202.

¹² Ester Saus, Virginia Soria, Geòrgia Escaramís, Francesca Vivarelli, José M Crespo, Birgit Kagerbauer, José Manuel Menchón, Mikel Urretavizcaya, Mònica Gratacòs y Xavier Estivill, "Genetic variants and abnormal processing of pre-miR-182, a circadian clock modulator, in major depression patients with late insomnia", *Human Molecular Genetics*, vol. 19, 2010, pp. 4017-4025.



aumentan la expresión de un grupo de miR (miR-310, miR-311 y miR-312). Esto es interesante, pues se ha reportado que diferencias en la sensibilidad a drogas recreativas predisponen de manera no bien entendida a las adicciones, por lo que esta diferencia en sensibilidad hacia las drogas podría deberse a una expresión diferencial de ciertos miR.

También se ha estudiado la posible participación de los miR en alteraciones metabólicas, como la diabetes o la obesidad. Uno de los primeros problemas que predisponen a un individuo al desarrollo de diabetes tipo 2 es el defecto en la señalización de insulina. Se ha demostrado que la expresión de miR-103 y miR-107 aumenta en ratones obesos. Cuando se aumenta experimentalmente la expresión de estos miR, ya sea en el hígado o en tejido graso, se altera la homeostasis de la glucosa, mientras que, si se apaga su expresión, se estabiliza el receptor de insulina, se aumenta su señalización, disminuye el tamaño de los adipositos y se potencia la absorción de glucosa estimulada por insulina.¹³

Algo realmente sorprendente es el hallazgo de miR de plantas en el suero y el tejido humanos. Estos miR se adquieren por la ingesta de alimentos como el arroz. Específicamente, se detectó el miR-168a del arroz en suero y se observó que es

capaz de unirse al ARN mensajero de una proteína adaptadora del receptor de lipoproteínas de baja densidad, inhibiendo su expresión y causando con ello una disminución en la remoción de lipoproteínas de baja densidad del suero.¹⁴ El hecho de poder alterar la expresión genética con los miR que ingerimos por medio de plantas abre muchas posibilidades, pues se puede concebir la producción de plantas transgénicas que produzcan miR con los cuales se pueda combatir enfermedades como las antes expuestas. Por otro lado, también se vuelve muy importante el estudio de los miR endógenos de plantas para conocer cuáles de ellas pueden afectar genes en humanos.

Además de estudiar los miR y sus genes-blancos, otra estrategia que se está siguiendo es la búsqueda de otras moléculas que regulen la expresión de estos. Por ejemplo, se encontró que la curcumina —un polifenol derivado de la cúrcuma (pariente del jengibre) y componente del curry comúnmente usado en la comida hindú— inhibe la sobreexpresión del miR-21. Al utilizar curcumina en un modelo de pollo en el que se puede medir la migración celular, la invasión y la tumorigénesis, se observó que se inhiben estas actividades en las células cancerosas.¹⁵ Este tipo de compuestos reguladores de la expresión de los miR podría usarse terapéu-

¹³ Mirko Trajkovski, Jean Hausser, Jürgen Soutschek, Bal Bhat, Akinc Akin, Mihaela Zavolan *et al.*, “MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity”, *Nature*, vol. 474, 2011, pp. 649-653.

¹⁴ Lin Zhang, Hou Dongxia, Chen Xi, Li Donghai, Zhu Lingyun, Zhang Yujung, Li Jing, Bian Zhen, Liang Xiangying, Cai Xing, Yin Yuan *et al.*, “Exogenous plant MIR168a specifically targets mammalian LDLRAP1: evidence of cross-kingdom regulation by microRNA”, *Cell Research*, vol. 22, 2011, pp. 107-126.

¹⁵ Giridhar Mudduluru, Jonahunnatha N. George-William, Santoshi Muppala, Irfan a Asangani, Regalla Kumarswamy, Laura D. Nelson *et al.*, “Curcumin regulates miR-21 expression and inhibits invasion and metastasis in colorectal cancer”, *Bioscience Reports*, vol. 31, 2011, pp. 185-197.

ticamente para controlar la presencia de ciertos miR en tumores.

El amplio potencial que tienen estas moléculas se refleja en las nuevas compañías cuyo propósito es estudiarlas y desarrollarlas, no solo como moléculas terapéuticas sino como biomarcadores para ayudar al diagnóstico y pronóstico de enfermedades. Por ejemplo, se ha encontrado que la presencia de ciertos miR puede distinguir entre células B malignas y células B normales en pacientes con leucemia crónica linfocítica, o que puede determinar la eficacia en la respuesta a diferentes tratamientos. Además, el utilizar los miR como marcadores tiene la ventaja de que pueden ser localizadas en la sangre, por lo que no es necesario hacer biopsia del tejido enfermo.

De 2007 a la fecha, al menos tres compañías han empezado a trabajar en este ámbito: Regulus, Santaris-Pharma a/s y MiRNA Therapeutics. En 2010 se probó en chimpancés la eficacia en el uso de

oligonucleótidos modificados (*locked-nucleic acids* o LNA) complementarios de los miR como antivirales. Se encontró que el miR-122, el cual se expresa en el hígado, se requiere para el desarrollo de la infección del virus de hepatitis tipo C (HCV).

Se trató con LNA complementarios del miR-122, de manera sistémica, a chimpancés infectados crónicamente con HCV, y esto suprimió la infección viral, aun después del tratamiento, sin efectos laterales y sin evidencia del desarrollo de alguna resistencia viral, con lo cual se demostró que este tipo de moléculas puede ser usado de manera segura.¹⁶

Actualmente se está evaluando este tipo de oligonucleótidos en humanos y algunos se encuentran en la fase clínica II, por lo que en un futuro no muy lejano estas moléculas, a las cuales no se les dio ninguna importancia en su descubrimiento, podrían ser la cura para una amplia variedad de enfermedades y alteraciones metabólicas.

¹⁶ Robert E. Lanford, Elisabeth S. Hildebrandt-Eriksen, Andreas Petri, Robert Persson, Morten Lindow, Martin E. Munk *et al.*, "Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection", *Science*, vol. 327, 2010, pp. 198-201.