

## Expresión génica y silenciamiento génico

Hasta los años '90, el ARN parecía tener un papel secundario en la historia de la biología celular. Su rol aparentaba limitarse a llevar un mensaje, desde el escenario del ADN hasta el de las proteínas. EL ADN, con su función directiva, daba órdenes de lo que debía ocurrir en la célula. Y las proteínas, protagonistas, llevaban a cabo todas las “actividades” celulares.

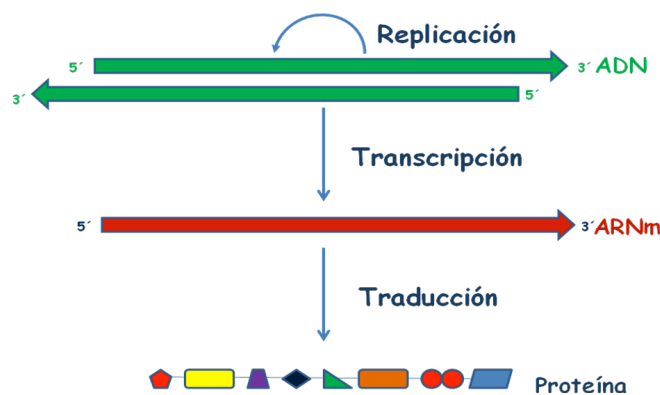
Ahora se sabe que esta historia no es exactamente así. Se ha demostrado que el ARN, al igual que el ADN, puede dar órdenes (porta un mensaje en sí mismo) y también cumple otras funciones muy importantes en la célula, que exceden al papel de mensajero.

Entre otras cosas, se ha descrito un mecanismo mediante el cual el ARN regula la expresión de ciertas regiones del ADN, y define qué proteínas estarán presentes en la célula. Este mecanismo de regulación de la expresión génica se conoce como **Silenciamiento génico**.

### Dogma central de la Biología

El científico inglés Francis Crick, famoso por proponer junto a James Watson un modelo de estructura para el ADN (ver cuaderno nº 32, 100) y por ganar el Premio Nobel en 1962 por ese trabajo, también enunció el **dogma central de la biología** (ver cuaderno nº 3). Este concepto fundamental propone que la información genética fluye del ADN al ARN y luego a las proteínas (ver Figura 1). Cuando en una célula se requiere la síntesis de una proteína específica, la porción de ADN que la codifica será copiada en forma de ARN, mediante el proceso de **transcripción**. Luego el ARN formado, que se denomina *ARN mensajero*, es utilizado como molde para la síntesis de proteínas por el mecanismo de **traducción**. Son finalmente las proteínas quienes llevan a cabo la mayor parte de las actividades celulares. Hoy en día se sabe que este dogma presenta algunas excepciones (ARN con actividad catalítica, virus con un genoma formado por ARN, etc.)

Figura 1.



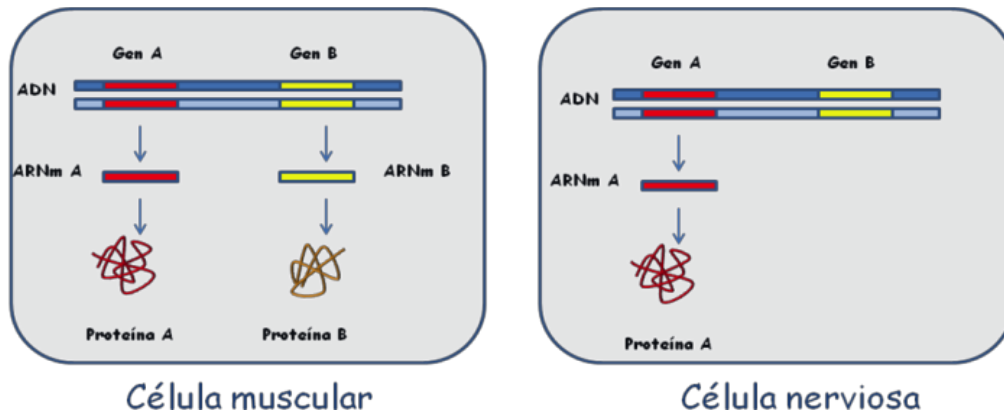


## Regulación de la expresión génica

Absolutamente todas las células que componen un organismo contienen la misma información genética en su ADN (ver cuaderno n° 3). Un ser humano adulto está compuesto por aproximadamente 100 billones (millones de millones) de células. El núcleo de cada una de ellas contiene un total de dos metros de ADN (súper condensado y enrollado) con 30.000 genes en su secuencia. Sin embargo, no todos los genes se expresan en todas las células, ni lo hacen todo el tiempo, ni durante el mismo período. Es esa expresión diferencial de genes la que define que en un mismo organismo existan muchos tipos celulares. Por ejemplo, una célula nerviosa posee la misma información genética que una célula muscular del mismo organismo (ver Figura 2). Pero ¿cómo puede ser que estos dos tipos celulares difieran tanto en estructura y función? Esto se debe a que existen mecanismos de regulación de la expresión génica que definen qué genes se expresan y en qué momento en cada tipo celular. Se podría decir que, en diferentes tipos celulares, hay genes que están “encendidos” o “activos”, mientras que otros están “apagados” o “inactivos”, y esto determina las características que expresa la célula.

Decir que un gen está “encendido” o “activo” significa que, a partir de ese gen, se está transcribiendo el ARNm (mensajero) que a su vez dirigirá la síntesis de la proteína correspondiente. Como representa la Figura 2, en la célula muscular tanto el gen A como el gen B están “encendidos”. Mientras que en la célula nerviosa, el gen B está “apagado”. Es decir que la proteína B no estará presente en la célula nerviosa. Evidentemente, el gen B determina una característica que está presente en la célula muscular, pero está ausente en las neuronas.

### Figura 2.



Rol de la expresión génica en la diferenciación celular. Fuente: ArgenBio

## El Silenciamiento génico

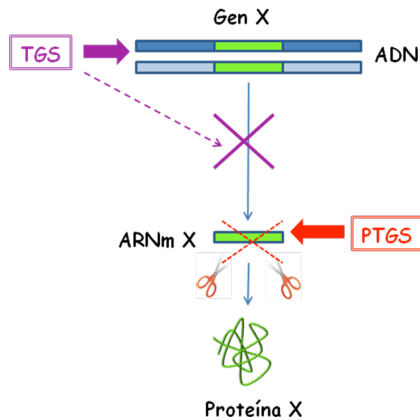
En la célula existen muchas formas de regular la expresión génica, es decir, de “prender” o “apagar” algún gen. El **silenciamiento génico** constituye una de esas maneras. A continuación se detallan algunas características de este proceso:

- Es un mecanismo celular mediante el cual se inhibe la expresión de genes.
- Controla la expresión de genes endógenos y exógenos.
- Presenta un papel importante en la regulación del desarrollo, en la diferenciación celular y en la defensa contra genes de organismos invasores (foráneos) y transposones.
- Puede ocurrir tanto en el núcleo como en el citoplasma de la célula.
- Puede regular en la etapa de transcripción y de traducción.
- El ARN doble cadena suele ser la señal de activación del mecanismo de silenciamiento génico.

Hasta el momento se ha demostrado que el Silenciamiento génico ocurre en:

- Plantas.
- Algas unicelulares.
- Hongos.
- Nematodos (*C. elegans*).
- La mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*).
- Células de mamíferos.

La represión de la expresión de los genes mediante el silenciamiento génico puede ocurrir a dos niveles: **transcripcional** y **post-transcripcional**, tal como se muestra en la siguiente **Figura 3**.



**Nivel de acción del silenciamiento transcripcional (TGS) y post-transcripcional (PTGS).** Fuente: ArgenBio

### El silenciamiento génico transcripcional (TGS, en inglés “Transcriptional Gene Silencing”).

Ocurre en el núcleo de la célula. Mediante el TGS se inhibe la síntesis de ARNm, es decir, no ocurre la transcripción. En este caso, los genes están silenciados por modificaciones a nivel de ADN, que implican su metilación (adición de un grupo metilo  $-CH_3$  a una molécula) o remodelamiento. Se propone que el incremento de metilación del ADN induce, posiblemente, la formación de heterocromatina, es decir, zonas de ADN de alta densidad que impiden el acceso de la “maquinaria transcripcional” y que por ende los genes no se expresan.

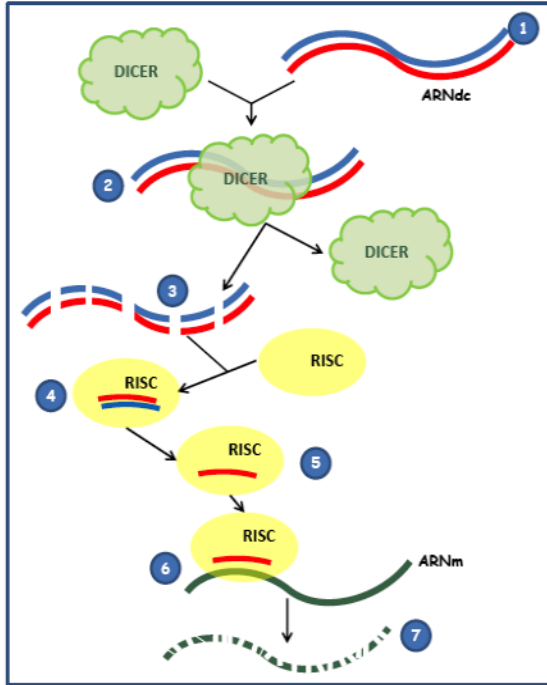
En cambio, en el **Silenciamiento Génico Postranscripcional** (PTGS por su traducción en inglés “Post-Transcriptional Gene Silencing”), sí hay transcripción del gen silenciado. Lo que ocurre es que el ARN mensajero sintetizado es degradado de forma específica, en función de su secuencia. En este caso tampoco habrá síntesis proteica del gen que está siendo “silenciado”.

Las primeras investigaciones en el área proponían que el TGS y el PTGS eran fenómenos independientes. Sin embargo, se encontraron más tarde evidencias en algunos virus y transgenes que inducían ambos procesos, sugiriendo que se trata de dos mecanismos alternativos pero no excluyentes de regulación de la expresión génica.

### Mecanismo molecular del silenciamiento génico transcripcional (TGS)

Muchos de los detalles bioquímicos del silenciamiento génico todavía no fueron determinados con exactitud para los diferentes organismos en los que fue descrito

este mecanismo. Además, las etapas de este proceso no son conservadas en todas las especies sino que las vías presentan diferencias. Sin embargo, tal como se conoce hoy en día, el silenciamiento génico ocurre de acuerdo a ciertos principios conservados (ver **Figura 4** en la página siguiente):



Mecanismo molecular de silenciamiento génico post-transcripcional. Fuente: ArgenBio

1. La primera etapa involucra la presencia un ARN doble cadena (ARNdc)
2. Regiones del ARNdc son reconocidas de manera específica por su secuencia. El complejo proteico que lleva a cabo dicho reconocimiento se denomina DICER
3. DICER cataliza la degradación del ARNdc, formando moléculas de ARN de menor longitud (21-26 nucleótidos).
4. Estos ARN pequeños de doble cadena se unen a otro complejo proteico, llamado RISC.
5. Una de las dos hebras de las moléculas de ARN pequeñas es eliminada.
6. La otra hebra permanece unida al complejo RISC, sirviendo de molde para el reconocimiento específico de ARN mensajeros con la misma secuencia.

El ARN mensajero reconocido, es degradado. Por ende, no habrá síntesis de proteína a partir del ARN mensajero que fue reconocido por el complejo RISC. De esta forma, el gen que codifica para el ARNm fue silenciado.

En conclusión, el mecanismo de silenciamiento génico garantiza que la presencia de ARNdc gatillará la degradación de ARN mensajero con secuencia semejante. Al ser hidrolizado, el ARNm ya no podrá oficiar de molde durante la síntesis proteica. Por lo



Nº

que no habrá producto proteico a partir del gen que codifica para dicho ARNm, es decir, se “silenció” la expresión de dicho gen.

En eucariotas, existen cientos de genes en el genoma que codifican para moléculas de ARN pequeñas que al ser expresadas adquieren estructura de doble cadena. Estas moléculas de ARN doble cadena activan a la maquinaria del silenciamiento génico, regulando la expresión de genes endógenos en eucariotas.

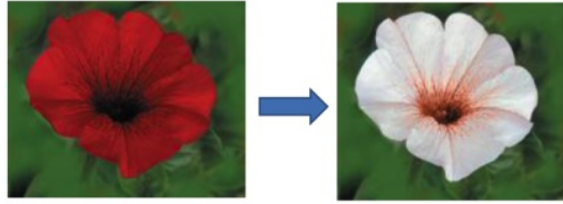
A diferencia de los seres humanos y otros vertebrados que han desarrollado complejos sistemas inmunes como defensa a infecciones de microorganismos, en organismos más primitivos que carecen de un sistema inmune eficiente, se ha demostrado que el silenciamiento génico resulta ser un importante mecanismo para la protección de infecciones virales. ¿Cómo ocurre esta defensa? La información genética de algunos virus consiste en ARN doble cadena y muchos otros virus, que son de ARN simple cadena, poseen en alguna etapa de su ciclo reproductivo ARN doble cadena. Una infección viral comienza cuando el ARN del virus entra en la célula. Entonces, el ARN se une al complejo DICER, y es fragmentado en moléculas más pequeñas. Esto activa al complejo RISC, por lo que el ARN viral es degradado y la célula infectada sobrevive a la infección.

En plantas y en algunos gusanos como *C. elegans* (*Caenorhabditis elegans*), el silenciamiento se inicia localmente pero puede expandirse hacia otros lugares del organismo. A este mecanismo se lo denomina *silenciamiento sistémico*. Hasta el momento, la señal que amplifica al silenciamiento no ha sido identificada, pero se postula que la misma debe ser algún tipo de ARN (o al menos alguna molécula que tenga algún componente de ARN), de manera tal de asegurar la especificidad de secuencia.

## Primeras voces del silenciamiento

Los primeros indicios del mecanismo de silenciamiento génico fueron observados a principios de los años 90. En ese entonces, los resultados fueron muy difíciles de explicar. Un grupo de investigadores que trabajaban en rutas de biosíntesis de pigmentos en flores, buscaban intensificar el color rojo de las flores de petunia. Para lograr su objetivo, introdujeron una copia adicional de un gen involucrado en la síntesis de pigmentos rojos mediante Ingeniería Genética (ver Cuaderno nº 4). El resultado no fue el esperado: obtuvieron flores blancas en lugar de las de color rojo intenso que esperaban.

**Figura 5.**



Los científicos buscaban lograr petunias más hermosas, de rojo más intenso en sus pétalos. Pero algunas de las petunias perdían su color por completo! Fuente: "The Nobel Prize in Physiology or Medicine for 2006."

Por otro lado, investigadores de Inglaterra, lograron proteger a plantas de infecciones virales al introducirles genes del mismo virus causante de la enfermedad. Hasta ese momento, resultaba muy difícil explicar las observaciones.

En febrero de 1998, los investigadores Andrew Fire y Craig Mello publicaron sus descubrimientos en la revista científica *Nature* respecto del trabajo que realizaban en regulación de la expresión génica del gusano *C. elegans*. Los investigadores buscaban un modo eficiente de silenciar genes como estrategia para estudiar su función en el desarrollo de este nematodo. Estos resultados clarificarían los resultados contradictorios obtenidos anteriormente en petunias, hongos y plantas infectadas con virus.

El experimento crucial consistió en introducir, mediante inyecciones, ARN del gen *unc-22*, implicado en el proceso de contracción muscular. Al inyectar el ARN mensajero simple cadena, no se obtenía ningún efecto visible, y la contracción muscular de los gusanos era normal. Sin embargo, al inyectar ARN doble cadena, los gusanos presentaban grandes espasmos, tal como también ocurría en aquellos gusanos que carecían del gen *unc-22*.

En esta publicación, Fire y Mello demostraron que es posible el silenciamiento específico de un gen mediante la introducción en la célula de ARNdc con secuencia homóloga al gen. Además, proponen que este fenómeno es mediado por un mecanismo endógeno natural, que tiene como consecuencia la degradación del ARNm y que es usado por la célula para controlar la expresión génica. Finalmente, sugieren una conexión entre este mecanismo y el fenómeno descrito en plantas.

Este trabajo logró una excepcional repercusión en la comunidad científica, valiéndoles a Fire y Mello el premio NOBEL en Fisiología y Medicina en 2006.

### Aplicaciones del silenciamiento génico en Biotecnología

Además de las funciones naturales del silenciamiento génico, el uso de este mecanismo como herramienta en biotecnología abre la puerta a nuevas posibilidades, permitiendo el "apagado" de genes de manera selectiva.

Se pueden introducir moléculas de ARN en células u organismos completos, desencadenando la degradación del ARNm homólogo y, de esta forma, silenciando la

---

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



expresión de un determinado gen. Esta técnica puede ser aplicada en diferentes áreas, biotecnología en plantas, fisiología animal, medicina, estudio de nuevas drogas, etc.

### **Aplicaciones del silenciamiento génico en Biotecnología Vegetal**

En plantas superiores, el silenciamiento génico mediado por ARN es un mecanismo adaptativo que induce la formación de defensas antivirales sistémicas, en respuesta a la exposición a un virus. Además, se están desarrollando plantas genéticamente modificadas, en las que se introducen construcciones que darán origen a moléculas de ARN doble cadena, capaces de inhibir la expresión de genes endógenos de manera selectiva y con algún fin determinado. Existen numerosos desarrollos biotecnológicos en los que se ha incrementado la calidad de alimentos por silenciamiento génico: plantas de café con contenido reducido de cafeína en grano, maíz con mayor valor nutricional en su componente proteico, mandioca con un 99% menos de laminarían (compuesto que en el tracto digestivo genera cianuro, altamente tóxico), entre muchos otros.

Otro ejemplo de mejoramiento por silenciamiento de genes, es el desarrollo de papas con menores niveles del aminoácido asparragina en tubérculo. Algunos alimentos procesados contienen pequeñas cantidades de acrilamida, una sustancia que puede resultar tóxica para el sistema nervioso. La acrilamida se forma en alimentos que contienen almidón (harina de trigo, papas, etc.) cuando se hornean o fríen. La industria alimenticia busca bajar los niveles de acrilamida en sus productos. Se han desarrollado plantas de papa transgénicas con menores niveles del aminoácido asparragina en tubérculo a través del silenciamiento génico. Las papas fritas hechas a partir de estas papas contienen hasta 20 veces menos de acrilamida que las papas de plantas no genéticamente modificadas.

Además, se ha logrado mejorar el rendimiento y calidad de la madera, silenciando genes involucrados en la síntesis de lignina. Para la producción de papel, el pulping químico de la madera resulta ser un proceso sumamente costoso y agresivo para el medioambiente que consiste en separar la lignina de la celulosa y de la hemicelulosa (ver Cuaderno nº 76). La obtención de plantas con bajo contenido de lignina significa una reducción de costos y contaminación ambiental en la industria del papel. El silenciamiento de la última enzima en la ruta de biosíntesis de lignina (Pt4CL1) en álamos produjo árboles con una reducción del 45% en el contenido de lignina que fue compensado con un incremento en el nivel de celulosa del 15%.

### **Aplicaciones del silenciamiento génico en medicina**

El descubrimiento del silenciamiento génico aumentó las esperanzas de obtener mejores tratamientos para variados desórdenes de salud, incluyendo infecciones virales, enfermedades cardiovasculares, cáncer y desordenes metabólicos. En ciertas





enfermedades, algunos genes se expresan más de lo habitual. Por lo tanto, al silenciarlos, puede aliviarse el problema en cuestión.

Hasta el momento, no se ha aprobado ninguna droga basada en el mecanismo de silenciamiento génico para su comercialización ni para su uso en humanos. Sin embargo, se han llevado a cabo experimentos exitosos en animales, y muchas sustancias están siendo probadas en ensayos clínicos. Por ejemplo, se está analizando la posibilidad de usar ARNdc como tratamiento para la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), que se trata de una enfermedad ocular en la que las áreas del centro del campo visual empiezan a perder nitidez. La DMAE se caracteriza por la formación de vasos sanguíneos anormales en la zona central de la retina, generada por la presencia de un factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Al inyectar en el ojo ARNdc con la misma secuencia que el ARN mensajero que codifica para la proteína VEGF, se silencia el gen y, por ende, habría menor cantidad de VEGF. Esto podría prevenir la formación de capilares y el desarrollo de la enfermedad DMAE.

Se está estudiando la posibilidad de aplicar el mecanismo de silenciamiento génico como método para combatir el virus RS, que causa infecciones respiratorias severas en niños pequeños. El principio del tratamiento consistiría en inhalar ARNdc de secuencias homólogas al virus, por lo que los virus en los pulmones serían inactivados y la infección controlada. Se ha llevado a cabo un estudio en humanos (voluntarios y saludables) y el tratamiento no mostró ningún efecto adverso serio.

También hay estudios de silenciamiento en animales y cultivos de células. En una investigación reciente en animales (roedores y monos), el uso de ARNdc resultó exitoso en el silenciamiento de genes involucrados en altos niveles de colesterol. Además se han llevado a cabo experimentos en células humanas, en los cuales se ha reducido la actividad del virus HIV del SIDA, por silenciamiento génico.

En resumen, en menos de 20 años ha habido un crecimiento exponencial en el entendimiento del proceso de silenciamiento génico. Se están investigando aplicaciones de este mecanismo natural en diferentes áreas: protección vegetal ante la infección de virus, modificaciones metabólicas en plantas que se traducen en mejores alimentos, árboles con maderas más aptas para la producción de papel, vacunas orales comestibles en plantas. Por último, pero no menos importante, se está avanzando en desarrollos de aplicación del silenciamiento génico con fines terapéuticos en humanos.



## **CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS**

Uno de los aspectos importantes para trabajar con los alumnos a partir de la introducción que presenta este Cuaderno, es el carácter cambiante de la ciencia. Es decir, es interesante discutir en la clase el hecho de que la ciencia es una actividad humana, en la que los investigadores se hacen preguntas y buscan respuestas, y llegan a resultados que, a su vez, pueden generar nuevas preguntas. Es decir que la ciencia es un conjunto de conocimientos que buscan explicar el mundo que nos rodea, y se van construyendo con el tiempo y con el aporte de muchos investigadores. Esto hace que la ciencia sea algo provisorio y perfectible, es decir que lo que se considera válido hoy, puede no serlo en el futuro, a la luz de los nuevos conocimientos. En este Cuaderno, este carácter cambiante de la ciencia se manifiesta en los nuevos conocimientos acerca de las funciones del ARN.

Para entender esta afirmación acerca de las nuevas funciones del ARN en el proceso de silenciamiento de genes, se sugiere que se estudie previamente la función del ADN, el proceso de síntesis de proteínas, y la función del ARN en las diferentes etapas de este proceso. Es decir, las funciones del ARN como mensajero, como ARN ribosomal y como ARN de transcripción. Esto implica, además, estudiar la estructura química del ARN, los tipos de bases nitrogenadas que lo forman, sus similitudes y sus diferencias con el ADN. Estos contenidos se pueden incorporar al trabajar biomoléculas, o genética y herencia. La idea es trabajar en primera instancia a partir de los conocimientos más difundidos acerca del ADN como la información que determina las características y funciones de los seres vivos. Luego se incorpora el proceso de síntesis de proteínas como un paso intermedio entre el ADN y las características. Y, una vez comprendido este tema, se puede ampliar y complementar con los nuevos conocimientos acerca de la función del ARN en el silenciamiento de los genes. Es decir, la función del ARN en la expresión de los genes.

Otro aspecto importante a trabajar con los alumnos, es la unidad y diversidad de las células. Es importante que quede claro que todas las células de un mismo organismo tienen el mismo ADN (excepto las células sexuales que tienen la mitad). La pregunta que se puede plantear a continuación es, ¿por qué si todas las células tienen la misma información genética, son tan diferentes entre sí? Por ejemplo, ¿por qué una célula de la piel y una neurona son tan diferentes? O, ¿por qué los ojos se ven tan diferentes a la piel, si ambos órganos están formados por células con la misma información genética? Las respuestas a estas preguntas se concentran en la idea de “genes activos o encendidos” y “genes inactivos o apagados”. En otras palabras, las características particulares que presentan las células se deben a la especialización y diferenciación celular que ocurre en una etapa temprana del desarrollo embrionario. En esta etapa se determina que sólo los genes que determinan las características propias de esos órganos están “encendidos” en ese lugar. Dicho de otro modo, los genes que dan característica de “ojo” se “apagan” en la piel, mientras que los genes que dan

---

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



Nº

características de piel quedan “apagados” en los ojos. En este caso nos referimos específicamente a algunos genes, ya que seguramente hay muchos genes que se encuentran “activos” en ambos tipos de células pero no serían los que determinan sus diferencias.

A su vez, se puede ampliar este concepto y trabajar las diferencias en cuanto al espacio extracelular. Por ejemplo, la diferencia entre las células de la piel y las células óseas se basan en la expresión genética y esto, a su vez, influye en el medio extracelular.

Aunque las células de la piel y las de los huesos tengan la misma información genética, el medio extracelular (intercelular) es lo que le da un aspecto tan diferente al órgano. En el caso de la piel, las células están rodeadas de sustancias como el colágeno que le dan elasticidad, mientras que el espacio extracelular en los huesos acumula sales de calcio que le dan su textura rígida.

Por último, con alumnos de años más avanzados se puede trabajar ambas ideas, la de ciencia cambiante y la de especialización del ADN, en referencia a un tema difundido como es la clonación de animales. Como ya se planteó en los Cuadernos nº 9 y nº 56, un aspecto interesante para trabajar con los alumnos se refiere al concepto mismo de la clonación. Habitualmente, se considera la clonación una técnica nueva debido, fundamentalmente, a la gran difusión que recibió en los medios de comunicación la clonación de la oveja Dolly. Es interesante conocer que la clonación es un procedimiento antiguo en plantas, y presenta diferencias con la clonación de animales cuyas células no tienen la característica de totipotencialidad que sí tienen las células vegetales. La totipotencialidad es lo que le permite a cualquier célula vegetal, incluso adulta, dar origen a un organismo completo. En tal sentido, es interesante trabajar con los alumnos las implicancias que tuvo la clonación de Dolly en cuanto a los conocimientos acerca del ADN y su función. La clonación de mamíferos replanteó algunas teorías existentes acerca del ADN y de su especialización. Según esta teoría las células adultas de mamíferos perdían su totipotencialidad, debido a la “inactivación o apagado” de segmentos de ADN durante el desarrollo embrionario. Esto determinaba que las células adultas no pudieran dar origen a un organismo completo. Sin embargo, y a pesar de las dificultades que sufrió Dolly, esta oveja clonada se originó a partir del ADN extraído de células adultas. Es decir que el ADN de las células adultas empleadas en la clonación, pudieron “encender” nuevamente todos sus genes que estaban “apagados”, y dar origen a un nuevo organismo completo. Es decir que la clonación animal replantea conocimientos científicos, y aporta nuevos datos acerca de la función del ADN.

## ACTIVIDADES

### Actividad 1. Revisión de conceptos teóricos

---

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



Indicar si cada una de las siguientes afirmaciones es Verdadera o Falsa y justificar.

- El silenciamiento genico postranscripcional “silencia” a las proteínas porque las degrada específicamente.
- El silenciamiento génico es un invento del hombre al que se le han encontrado aplicaciones biotecnológicas.
- El ARN capaz de desencadenar el silenciamiento génico es una molécula de doble cadena
- Todas las células que componen a un organismo son idénticas entre sí.
- Los ARN degradados mediante el silenciamiento génico son degradados en función de la secuencia que presentan.

### Respuestas

- Falso. No son las proteínas las biomoléculas degradadas, sino que es el ARN mensajero el que es digerido específicamente.
- Falso. El silenciamiento génico es un mecanismo natural descrito en plantas, nematodos, algas unicelulares, eucariotas. Es cierto que se le encontraron diversas aplicaciones en biotecnología, medicina, estudios de fisiología, entre otros.
- Verdadero. Tal como lo probaron Fire y Mello, la degradación del ARN mensajero sólo era gatillada al inyectar ARN doble cadena. Mientras que la inyección con ARN simple cadena (sentido o antisentido) no tenía efecto alguno sobre los nematodos.
- Falso. El material genético de cada una de las células que componen a un organismo es idéntico entre sí. Sin embargo, las células de un organismo adquieren diferentes formas y funciones a partir de la diferenciación celular.
- Verdadero. El reconocimiento entre el ARN molde que interactúa con el complejo RISC y el ARN mensajero a degradar, ocurre a nivel de secuencia nucleotídica, por eso se dice que el silenciamiento es específico de secuencia.

### Actividad 2. Análisis de una experiencia

En esta actividad se propone analizar el experimento realizado por Fire y Mello, trabajo que les significó el Premio Nobel en 2006.

El experimento crucial que llevó a una más clara comprensión del silenciamiento génico fue realizado en el nematodo *C. elegans*, un animal milimétrico. Fueron Andrew Fire y Craig Mello quienes estudiaban cómo estaban regulados los genes involucrados en la movilidad de este pequeño animal. Entre otras cosas, los investigadores estaban estudiando un gen implicado en el proceso de contracción muscular. Cuando este gen

---

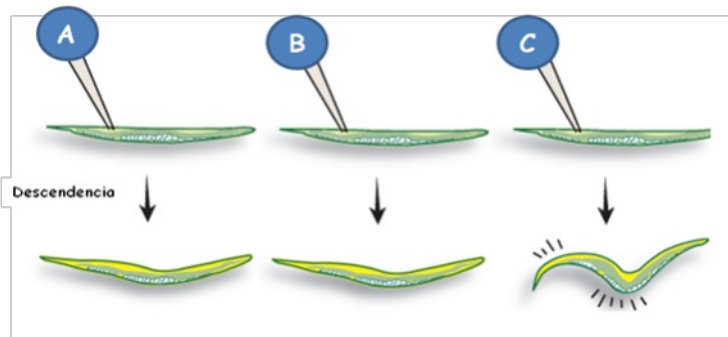
"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.

Nº

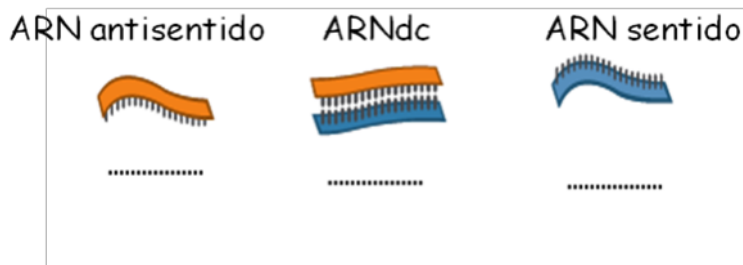
no se expresaba o estaba ausente en el gusano, el animal sufría de movimientos abruptos, como espasmos:



Una de las etapas experimentales consistió en inyectar en las gónadas (órganos del sistema reproductor que originan células sexuales) de *C. elegans* normales diferentes poblaciones de ARN y luego observar como era el movimiento de la descendencia. Como muestra la siguiente ilustración, al inyectar el **ARN A**, y el **ARN B** la gusanos presentaban movimientos normales. Sin embargo, al inyectarles la población de **ARN C**, los animales presentaron movimientos espasmódicos.

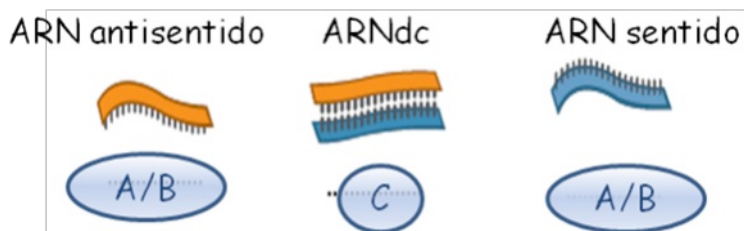


A partir de los conceptos debatidos en este cuaderno, definan cuál de las siguientes poblaciones de ARN corresponden a las muestras A, B o C de ARN inyectado. Justifiquen su elección.



### Respuestas -Actividad 2

La identidad de las muestras de ARN es la siguiente:



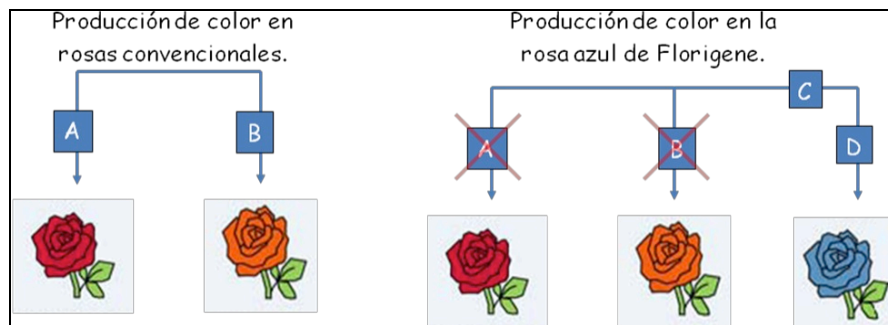
La elección se fundamenta en el hecho de que los gusanos cuando carecen del gen implicado en los movimientos, o cuando es defectivo, presentan movimientos espasmódicos. Es de esperarse que al inyectar ARN doble cadena con secuencia idéntica a dicho gen, se gatilla el mecanismo de silenciamiento génico. Es decir, se está inhibiendo su expresión. Situación comparable a la ausencia del gen, y por ende el comportamiento de los nematodos debe ser similar.

En cambio, la inyección de ARN simple cadena, sentido o antisentido, no desencadena el mecanismo de silenciamiento génico y por ende la expresión del gen es normal. En ambos casos la movilidad de los gusanos no manifestará ninguna anomalía.

### ACTIVIDAD 3. Silenciamiento génico en plantas

En esta actividad se propone analizar la estrategia utilizada en la obtención de una rosa azul por Biotecnología moderna. Luego de la introducción al tema, se busca que los alumnos vuelquen los conceptos debatidos en un párrafo que deben completar con los términos adecuados.

*Las rosas son famosas por sus colores hermosos, las hay rojas, amarillas, rosas, naranjas e incluso blancas. Todas estas variedades fueron obtenidas por mejoramiento clásico. Por cientos de años, se buscó desesperadamente obtener una rosa azul pero la rosa probó ser una candidata difícil para adquirir tan ansiado color. Sin embargo, el sueño fue concretado por las empresas Florigene y Suntory, quienes aplicaron el principio del silenciamiento génico en plantas y crearon la primera rosa azul de la historia. El objetivo fue logrado según la siguiente estrategia:*



Las enzimas A y B son variantes que se expresan a partir de un mismo gen, el gen *dfr*, y tienen la capacidad de catalizar la síntesis de pigmentos presentes en rosas. Estos pigmentos le confieren a la flor sus colores rojizos anaranjados característicos. La enzima C proviene de flores denominadas *Pensamientos*, y está implicada en la síntesis de pigmentos azules. La enzima D está codificada en el gen *dfr* de lirio azul.

---

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



Completar las palabras faltantes en el siguiente párrafo, a partir de los conceptos debatidos en este Cuaderno, en el cuaderno n° 72 (Biotecnología ornamental), en el n° 105 (Metabolismo celular), y el análisis de la figura anterior que representa la estrategia de obtención de la rosa azul de Florigene.

*“La rosa azul de Florigene Pty Ltd. fue obtenida mediante técnicas de..... Para ello se modificó la ..... involucrada en la síntesis de pigmentos. A partir de una rosa roja, se inhibió la expresión del..... mediante el mecanismo de ..... Luego de apagar la síntesis de pigmentos ..... en la flor, introdujeron en el genoma de la planta una copia del gen que codifica para la ..... implicada en la síntesis de ..... Este gen lo clonaron a partir de plantas de ..... Una vez “apagada” la producción de pigmentos rojos, y “encendida” la síntesis de pigmentos azules, los investigadores debieron introducir en el genoma de la rosa un nuevo ....., pero esta versión del gen proviene de ..... y por ende resulto de utilidad en la obtención de la tan ansiada rosa azul. El proyecto fue un éxito, la rosa azul existe y ya fue aprobada para su comercialización por los entes reguladores pertinentes de Australia. “*

### Respuestas-Actividad 3

*“La rosa azul de Florigene Pty Ltd. fue obtenida mediante técnicas de **Ingeniería genética**. Para ello se modificó la **ruta metabólica** involucrada en la síntesis de pigmentos. A partir de una rosa roja, se inhibió la expresión del **gen dfr** mediante el mecanismo de **silenciamiento génico**. Luego de apagar la síntesis de pigmentos **rojos** en la flor, introdujeron en el genoma de la planta una copia del gen que codifica para la **enzima C**, implicada en la síntesis de **pigmentos azules**. Este gen lo clonaron a partir de plantas de **Pensamientos**. Una vez “apagada” la producción de pigmentos rojos, y “encendida” la síntesis de pigmentos azules, los investigadores debieron introducir en el genoma de la rosa un nuevo **gen dfr**, pero esta versión del gen proviene de **lirios azules** y por ende resulto de utilidad en la obtención de la tan ansiada rosa azul. El proyecto fue un éxito, la rosa azul existe y ya fue aprobada para su comercialización por los entes reguladores pertinentes de Australia. “*

### ACTIVIDAD 4. Vacunas y ARN

A partir de la lectura de la Novedad: “Vacunas comestibles basadas en ARN de interferencia” publicada en el sitio del Consejo Argentino para la información y el

---

“El Cuaderno de Por Qué Biotecnología” es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



desarrollo de la Biotecnología –Argenbio [www.argenbio.org](http://www.argenbio.org)- se sugiere que los alumnos respondan a las preguntas que se exponen al final del texto.

### Vacunas comestibles basadas en ARN de interferencia

(Publicado el 14-05-2009)

La Fundación Gates otorgó un subsidio de U\$100.000 a Eric Lam y sus colegas de la Universidad Rutgers (Nueva Jersey) para la generación de vacunas antivirales en tomates y otras plantas.

Con la prevalencia de las enfermedades virales en todo el mundo, como la hepatitis C, influenza (incluyendo la porcina, aviar y otras), y el HIV/SIDA, el desarrollo de nuevas vacunas es un gran desafío. Además, la enorme variabilidad de los virus, que los ayuda a evadir al sistema inmune y a los medicamentos, hace que las vacunas y terapias tradicionales no sean efectivas a largo plazo. Por eso Lam se concentró en el uso del ARN de interferencia combinatorial, con el fin de evitar la evasión viral.

Es decir, en lugar de enfocarse en una determinada proteína o antígeno del virus, la estrategia se basa en una combinación de moléculas de ARN capaces de bloquear el ciclo de vida del virus atacando varios genes al mismo tiempo. Así, si un gen vital muta (cambia) impidiendo que actúe un medicamento, la vacuna igual sigue funcionando actuando sobre otros puntos del ciclo.

Sin embargo, uno de los principales problemas de este tipo de terapia es cómo hacer para administrar estas moléculas de una manera económicamente viable y a todas las personas que la necesiten. En este sentido, Lam logró modificar genéticamente tomates que tienen genes que codifican para los ARN que evitarán que funcionen determinados genes virales esenciales. La idea es hacer vacunas comestibles, que en lugar de llevar proteínas que funcionen como antígenos, lleven moléculas de ARN que bloqueen el ciclo del virus y éste no pueda replicarse.

- ¿Para qué sirven las vacunas antivirales?
- ¿De qué forma será administrada la vacuna desarrollada por el Dr. Eric Lam?
- ¿Cómo son obtenidas las vacunas antivirales utilizadas actualmente?
- ¿Cuales serán las ventajas de una vacuna comestible respecto de las vacunas convencionales?
- ¿Cuál fue la estrategia de desarrollo de la vacuna comestible desarrollada por el Dr. Lam?
- La expresión de varias moléculas de ARN en una misma vacuna, ¿tiene algún beneficio? ¿Cual?
- ¿Está a la venta el tomate transgénico que se utilizará para la inmunización contra virus?

### Respuestas:

- Las vacunas antivirales se administran generalmente para prevenir infecciones. Como respuesta a la vacunación el sistema inmunológico genera anticuerpos que eliminan al agente extraño y generan protección (inmunidad) ante una eventual exposición al agente viral en su estado natural. La respuesta del sistema inmune genera *memoria inmunológica*.
- La vacuna desarrollada por el Dr. Lam sería administrada oralmente. Se trataría de una vacuna comestible, un tomate que expresa un grupo de moléculas de

---

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.





Nº

ARN capaces de inhibir la expresión de genes vitales para el ciclo viral mediante silenciamiento génico.

- c. Las vacunas antivirales utilizadas en la actualidad pueden estar constituidas por el virus inactivado o por el virus atenuado, es decir, el mismo virus causante de la enfermedad pero muerto o sin virulencia. También existen vacunas que están compuestas por una parte del virus (el antígeno), que es capaz de generar una respuesta inmune pero sin riesgo de generar la enfermedad en el vacunado. Las vacunas se administran por medio de una inyección o por vía oral.
- d. La vacunación, tal como se la practica actualmente, enfrenta una serie de dificultades: el principal problema es el alto costo de las vacunas. Además las vacunas deben ser distribuidas en condiciones controladas (por ejemplo de temperatura) que garanticen que al momento de ser suministrada al paciente resulte eficaz en la generación de la respuesta inmune. Esto es difícil de garantizar cuando se trata de distribuir vacunas en lugares de difícil acceso. Existen grandes ventajas, en este sentido, para las vacunas comestibles: la producción de vacunas por cultivo resultaría ser una estrategia de mucho menor costo; además las plantas pueden ser cultivadas localmente, resolviendo el problema del transporte y la conservación. Otra ventaja es que las vacunas comestibles serían administradas en forma oral, lo que evitaría los molestos pinchazos y, más importante aún, el uso de jeringas con las implicancias de esterilidad que su uso significa.
- e. Para el desarrollo de la vacuna comestible el Dr. Lam tuvo que llevar a cabo la siguiente estrategia.
  - Identificar qué secuencias del VIRUS podrán ser utilizadas para silenciar genes del propio virus, y probar que dicho silenciamiento sea eficaz al inhibir el normal desarrollo del ciclo viral.
  - Clonar las secuencias de ADN que codifiquen para esos ARNs capaces de generar silenciamiento génico en el virus.
  - Introducir mediante técnicas de Ingeniería Genética estas secuencias en el genoma del tomate.
  - Probar que el tomate genéticamente modificado sea viable.
  - Probar que el tomate genéticamente modificado genere protección desencadenando una respuesta inmune en animales de laboratorio.
  - Llevar a cabo ensayos clínicos en humanos, a través de los cuales se pruebe que el tomate resulta efectivo en la generación de respuesta inmune en humanos y que no tiene efectos adversos sobre su salud.
  - Siendo que el producto, es decir, el tomate transgénico cumple con todos los requisitos, el Dr Lam deberá encarar el proceso de evaluación de las agencias regulatorias para poder demostrar que el tomate es inocuo para la salud



Nº

humana y animal, así como también establecer que no tendrá ningún efecto no deseado sobre el medioambiente.

- f. Sí, la expresión de varias moléculas de ARN capaces de inhibir el normal ciclo de vida del virus garantiza que si alguno de los genes “blanco” muta, existirán otras moléculas de ARN capaces de silenciar genes que no lo hayan hecho. Es decir, se ataca al virus por diferentes frentes, tal que si uno de ellos no resulta eficiente existen otros que garantizarán la eficacia de la vacuna.
- g. No, el tomate modificado genéticamente no está a la venta todavía. Se trata de un proyecto en pleno desarrollo, que una vez finalizado deberá cumplir con todas las normativas y etapas de evaluación para ser aprobado para el consumo humano y para su liberación al medio ambiente.

## MATERIAL DE CONSULTA

1. “Silenciamiento génico en plantas (RNAi)”. Lic. Paula Bey. Fac. de Cs Exactas y Naturales. UBA. Año 2007. Idioma: español. Documento disponible en la Biblioteca del Consejo Argentino para la información y el desarrollo de la Biotecnología: Argenbio: <http://www.argenbio.org/index.php?action=biblioteca&opt=8>
2. “Dos premios Nobel para el RNA”. Paula Cramer. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina. Revista Química Viva. Número 3, año 5, diciembre 2006. Idioma: español. <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/v5n3/cramer.htm>
3. Excelente animación sobre silenciamiento génico de la revista científica “Nature”. Idioma: inglés. <http://www.nature.com/focus/rnai/animations/animation/animation.htm>
4. Información para el público sobre el premio Nobel en Fisiología o Medicina de 2006. “The Nobel Prize in Physiology or Medicine for 2006.” The Nobel Assembly at Karolinska Institutet. Es un documento claro y resumido sobre Silenciamiento génico en relación al premio Nobel entregado a Andrew Fire y Craig Mello. Año 2006. Idioma Inglés. [http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/2006/info.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/info.html)
5. ARN de interferencia y su importancia en la Biomedicina Molecular. Jorge Luis Hernandez Garcia. Año 2005. Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica. Distrito Federal de México. Páginas 118 a 127. Idioma español.

---

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



Nº

6. RNA Silencing in Plants: Yesterday, Today, and Tomorrow. A. Eamens, M. Wang, N. Smith, y P. Waterhouse Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization Plant Industry. University of Sydney, Sydney. Australia. Año 2006. Idioma: inglés.