

Estudio del silenciamiento del gen p53 del langostino *Litopenaeus vannamei* mediante el sistema de ADN de interferencia (ADNi)

Doris Villanueva P¹, Max Salvatierra A^{2,3}, Eric Miahle³, Emmerik Motte^{3,4}

¹ Universidad Nacional de Tumbes, Av. Universitaria S/N, Tumbes, Perú

dorisvp18@gmail.com

² BIOTECOOP, Tumbes, Perú

maxsa1002@gmail.com

³ INCABIOTEC SAC, Jr. Filipinas 212, Tumbes, Perú

ericmialhe@yahoo.fr

⁴ CONCEPTO AZUL, Guayaquil, Ecuador

motte.emmerik@gmail.com

Resumen

El langostino blanco del pacífico, *Litopenaeus vannamei*, mundialmente se ha convertido en una de las especies más importantes en la acuicultura. En Perú, su producción ha ido aumentando gradualmente a través de los años, reportándose desde 3,328 Tm en el año 2003 hasta cerca de 22,017 Tm en el 2015, de la cual la región Tumbes aporta con aproximadamente el 83 % de producción nacional. Sin embargo, su cultivo sufre pérdidas económicas debido a los brotes de enfermedades virales tales como la ocasionada por el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV).

Debido a ello, en la actualidad se están realizando varios estudios empleando metodologías moleculares para la detección, control de infección e inhibición del WSSV. Encontrándose hasta el momento que el sistema de ARN de interferencia ha funcionado exitosamente para controlar la propagación de virus que afectan a *Litopenaeus vannamei*. Sin embargo, su aplicación requiere procesos muy costosos y es poco estable. En consecuencia, se desarrolló y aplicó una metodología dirigida a silenciar la expresión genes de *L. vannamei*, mediante un sistema de ADN de interferencia (ADNi), una técnica de silenciamiento génico post-transcripcional que es simple, barato, eficiente y además es capaz de ayudar a entender la función de los genes. El sistema de ADNi ha sido solo reportado en algunas plantas, ciliados y arqueas mas aún no ha sido explorado en el langostino. En este estudio, los efectos de la inyección de 10 µg de fragmentos de ADN doble cadena (ADNdc) correspondientes a los genes Lvp53, LvEF1α y GFP han sido analizados por qRT-PCR para evaluar la funcionalidad del sistema de interferencia a través de la variación de la expresión relativa de los genes Lvp53, LvDicer2, LvAgo2, LvMnSOD y LvGPx en hemocitos. Para ello cuantificamos el ARNm de cada uno de los genes usando una PCR en tiempo real a las 24 horas post-transfección. Nuestros resultados demostraron que el ADNdc de Lvp53 (185 pb) redujo la cantidad de ARNm de Lvp53 a una expresión relativa (RQ) de 0.36, es decir una eficiencia de silenciamiento de 64% respecto a los controles. Por otro lado, la introducción de ADNdc LvEF1α (500 pb) redujo aún más el nivel de expresión de Lvp53 en un 95% mostrando un RQ de 0.05 con respecto al control, sugiriendo la presencia de mecanismos alternativos que condujeron a la reducción de Lvp53. Mientras que la

aplicación del ADNdc de GFP elevó el nivel de expresión de Lvp53. Después, se evaluó la expresión relativa de LvMnSOD y LvGPx, dos genes regulados por Lvp53 y que participan en respuesta al estrés oxidativo de la célula. LvMnSOD fue regulado negativamente de manera significativa por efecto de ADNdc de Lvp53, sin embargo sucedió lo contrario con LvGPx. Finalmente, evaluamos el nivel de expresión de dos genes importantes que participan en el sistema de interferencia de genes, y se mostró que LvDicer2 fue altamente sobreexpresado por efecto del ADNdc Lvp53, mientras que Ago2 solo tuvo un ligero incremento con los mismos fragmentos de ADNdc, indicando así su participación en los procesos de ADNi en langostino.

En conclusión, se logró demostrar la existencia y funcionalidad de un sistema de silenciamiento génico inducido por fragmentos de ADNdc, denominado ADNi, en *L. vannamei* y que a su vez podría utilizar rutas similares al sistema de silenciamiento de genes por ARNi. Estos resultados abrirían a nuevas investigaciones, con el fin de silenciar la expresión de otros genes de importancia en langostinos. Este es el primer reporte de ADNi en crustáceos.