

# Efectos del ARN de interferencia en las funciones génicas de organismos acuáticos

✉ Mario P Estrada<sup>1</sup>, Juana M Lugo<sup>1</sup>, Jannel Acosta<sup>1</sup>, Yamila Carpio<sup>1</sup>,  
Ingrid Borroto<sup>1</sup>, Yuliet Morera<sup>2</sup>, Osmany González<sup>1</sup>,  
Tania Rodríguez<sup>2</sup>, Laida Ramos<sup>2</sup>, Alberto Huberman<sup>3</sup>

<sup>1</sup>División de Biotecnología Animal, Proyecto de Biotecnología Acuática,  
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB  
Ave. 31 e/ 158 y 190, AP 6162, CP 10600, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba  
E-mail: mario.pablo@cigb.edu.cu

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Marinas, CIM

Calle 16 No. 114, Miramar, Playa, CP 11300, Ciudad de La Habana, Cuba

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Nutrición, México

## RESUMEN

Recientemente se descubrió que el ARN de doble cadena es un inhibidor potente y específico de la transcripción génica en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*. Se han reportado resultados similares han en especies como *Drosophila melanogaster*, planaria, ratón, pez cebra, entre otras. El fenómeno del ARN de interferencia (ARNi) ocurre cuando el ARN de doble cadena (ARNdc) es procesado por un complejo proteico, lo cual genera moléculas de pequeño tamaño que se unen específicamente a una secuencia blanco de ARN mensajero y provoca su degradación, e impide que esta se exprese. La interferencia mediada por ARNdc es generalmente un mecanismo de silenciamiento génico posttranscripcional. En este trabajo hemos demostrado que mediante el uso de la tecnología del ARN de interferencia se puede estudiar la función génica en organismos acuáticos.

Este artículo describe la aplicación de esta técnica en dos organismos:

- Pez cebra (*Danio rerio*), modelo animal de gran importancia en la actualidad en el campo de la genética, la biología del desarrollo y la biomedicina.

- Camarón blanco (*Litopenaeus schmitti*), camarón del Océano Atlántico, especie muy importante desde el punto de vista económico.

Se estudió la función del factor de crecimiento miostatina, en el crecimiento y diferenciación de la masa muscular, así como en el crecimiento del pez cebra. Los resultados demostraron que la tecnología del ARN de interferencia constituye una herramienta útil en el estudio de la función biológica de genes involucrados en el desarrollo del pez cebra. Este trabajo constituye la primera evidencia de que a pesar de que la expresión de la miostatina en peces, a diferencia de los mamíferos, no se restringe al músculo esquelético, la función primordial de esta proteína en estos organismos está relacionada con el crecimiento y desarrollo de la masa muscular, debido a hiperplasia o hipertrofia de las fibras musculares. Además, se demostró que la inhibición de la miostatina promueve un fenotipo que presenta un incremento significativo en la masa muscular. Esta proteína es centro de atención de varios laboratorios a escala mundial que trabajan en la búsqueda de metodologías o técnicas que permitan inhibir de forma estable la miostatina. Si esto se realiza en especies de importancia económica, podría ser un resultado de gran impacto para la acuicultura cubana y mundial.

En la literatura no existen antecedentes de la funcionabilidad de la tecnología del ARNi *in vivo* en crustáceos. En estudios recientes se demostró que el mecanismo de silenciamiento génico vía ARNi es funcional en células de camarón en cultivo, pero no existen hallazgos de su aplicabilidad *in vivo*. Nuestro estudio constituye la primera evidencia de la utilidad de la metodología de silenciamiento mediante ARNdc en camarones adultos *in vivo*. En este trabajo, además, se aísla, clona y caracteriza por primera vez el ADNc de la hormona hiperglicémica (CHH) del camarón del Océano Atlántico. Esta hormona tiene una función primaria en la regulación energética en los crustáceos. Además, participa en la reproducción, la muda, la osmorregulación y el metabolismo de los lípidos en diferentes especies. En este trabajo se estudió también la habilidad del ARN de doble cadena para inhibir la función de la CHH en camarones.

## Introducción

El ARN de interferencia (ARNi) es el ARN de doble cadena (ARNdc) que se une específicamente a una secuencia blanco y provoca su degradación, impidiendo que esta se exprese [1]. La interferencia mediada por el ARNdc es generalmente un mecanismo de silenciamiento génico posttranscripcional (PTGS, del inglés posttranscriptional gene silencing) que se ha conservado a través de la evolución; aunque también puede ocurrir a nivel transcripcional y traduccional, pues la interfe-

rencia puede prevenir el procesamiento o la traducción de los transcritos endógenos; y a nivel de cromatina, ya que forma dominios de heterocromatina en el núcleo, que son críticos para la organización y la estabilidad del genoma [2].

En animales, fue descubierto por primera vez en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*, donde el ARNdc inducía el silenciamiento génico de secuencia específico [3]. El ARNi se ha utilizado como medio para la manipu-

1. Cheng J, Moore T, Sakamoto K. "RNA interference and human disease". *Mol Genet Metab* (2003); 80:121-8.

2. Hannon G. "RNA interference". *Nature* (2002); 418:244-51.

3. Fire A, Xu S, Montgomery M, Kostas S, Driver S, Mello C. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* (1998); 391:806-11.

lación de la expresión de genes experimentalmente y para probar la función de determinados genes a escala genómica [2].

Se ha demostrado que la interferencia mediada por el ARNdc, los mecanismos de silenciamiento post-transcripcional y de represión actúan generalmente en la etapa postranscripcional para la degradación de los transcritos del ARNm blanco. La degradación ocurre en el núcleo, en el citoplasma o en ambas localizaciones [4].

El proceso de silenciamiento génico postranscripcional mediado por ARNdc es una vía multipasos que requiere el proceso de iniciación, una interacción facilitada y la degradación del ARNm blanco. En algunos casos este proceso también puede envolver una degradación física del ARNdc activador y el mantenimiento o amplificación del silenciamiento de genes [2].

En pez Cebra (*Danio rerio*) se demostró que los embriones microinyectados con ARNdc específico para los genes que producen los fenotipos sin cola y *lac Z* mostraron una reducción en los niveles de ARNm endógeno. Entre el 20 y el 30% de los peces presentaron efectos específicos referidos al fenotipo sin cola [5]. Para determinar si el ARNdc podía atenuar la expresión de genes endógenos [6], microinyectaron embriones de pez cebra en estadios de 1 a 2 células con ARNdc específico para los genes *Zf-T* y *Pax 6.1* [6]. En este experimento, el 80% de los peces microinyectados mostraron efectos específicos. En este estudio no se reportó la ocurrencia de toxicidad, lo que sugiere que la interferencia mediada por ARNi es una herramienta útil para la inactivación génica secuencia específica en el pez cebra. En contraste con los resultados anteriores, se ha reportado que la microinyección de ARNdc en pez cebra induce efectos inespecíficos. Debido a que existían varias incógnitas con respecto a la función de la miostatina en peces y por la importancia que tendría para la acuicultura lograr un incremento de la masa muscular mediante la inhibición de esta molécula, se estudió su función mediante la tecnología del ARN de interferencia y su aplicabilidad en el pez cebra para el estudio de la función de este gen.

En camarones, especie de gran importancia económica, y con la cual se trabaja en varios laboratorios en el mundo para el estudio de los mecanismos moleculares que regulan su crecimiento, no se ha reportado silenciamiento génico mediado por ARNdc. En estos organismos acuáticos no se ha demostrado hasta el momento la habilidad de ARNdc para inducir silenciamiento génico en estadio adulto. Su funcionalidad sería de gran utilidad para comprender la regulación génica en estos animales y en un futuro lograr también una posible aplicación práctica.

## Resultados y discusión

### Silenciamiento del gen de la miostatina mediante ARNi produce fenotipo gigante en el pez cebra

La miostatina, también llamada factor de crecimiento y diferenciación 8 (GDF-8, del inglés Growth Differentiation Factor 8), es un miembro de la familia de factores de crecimiento y transformación de tipo  $\beta$  (TGF- $\beta$ , del inglés Transforming Growth Factor  $\beta$ ),

que funciona como regulador negativo del crecimiento y desarrollo del músculo esquelético en mamíferos, y cuando se elimina su expresión, en mamíferos, se produce un aumento dramático de la masa muscular debido a la hiperplasia, la hipertrofia de las fibras musculares o a ambas [7].

Para determinar si el ARNdc específico para la miostatina de tilapia es capaz de estimular el crecimiento de la masa muscular en el pez cebra, se microinyectó el ARNdc sintetizado en embriones de pez cebra en estadio de una a dos células. Se utilizaron dos dosis diferentes, una baja (5 moléculas de ARNdc por embrión), con el objetivo de conocer la dosis mínima de ARNdc que es capaz de provocar un efecto en la expresión de genes específicos, y otra ( $5 \times 10^6$  moléculas de ARNdc por embrión), que está en correspondencia con la dosis utilizada por otros investigadores. Como control negativo, para cada dosis se microinyectaron embriones del mismo desove con PBS 1X. A los dos meses y medio, el peso promedio de los peces microinyectados con  $5$  y  $5 \times 10^6$  moléculas de ARNdc se incrementó cerca del 39 y el 45%, respectivamente, comparado con sus controles. En ambos resultados se obtuvo un fenotipo que presentó un incremento significativo de la masa muscular (Tabla 1 y Figura 1 en [8]).

Además, como muestra la figura 2 el ARNdc no promovió efectos fenotípicos no específicos en los peces microinyectados, los cuales se mostraron saludables.

Tabla 1. Comparación del peso corporal promedio entre los peces microinyectados y no microinyectados a los 2.5 meses después de la fertilización

Experimento	Animales no microinyectados		Animales microinyectados		Valor de P <sup>d</sup>	Incremento en el peso
	No. de animales	Peso (g) <sup>a</sup>	No. de animales	Peso (g) <sup>c</sup>		
1 <sup>a</sup>	145	0.2052 ± 0.0149	130	0.2872 ± 0.0178	< 0.01	39 %
2 <sup>b</sup>	55	0.3135 ± 0.0359	55	0.4563 ± 0.0258	< 0.01	45 %

<sup>a</sup> Se microinyectó 5 moléculas de ARNdc.

<sup>b</sup> Se microinyectó  $5 \times 10^6$  moléculas de ARNdc.

<sup>c</sup> El peso se muestra como el promedio + desviación estándar.

<sup>d</sup> Los valores de P son el resultado de una prueba t de Student.

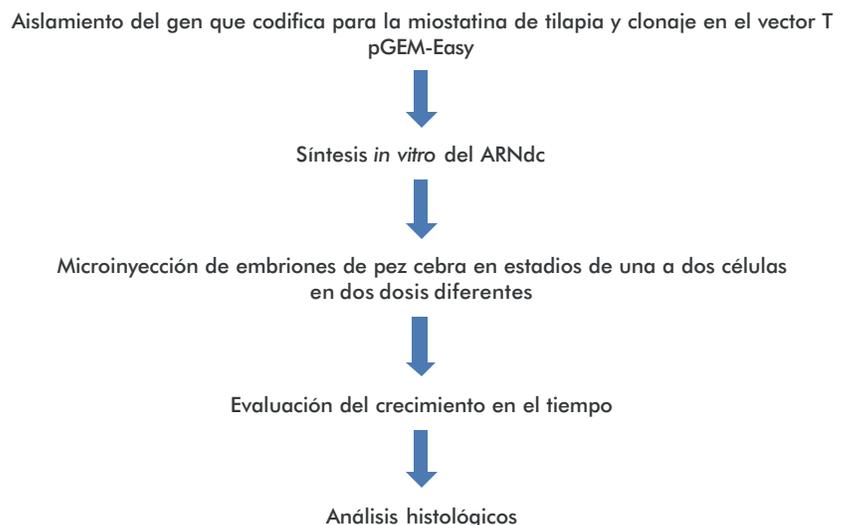


Figura 1. Procedimiento experimental para la obtención y ensayo de ARNdc de interferencia contra el gen de la miostatina en tilapia en pez cebra

4. Carthew R. "Gene silencing by double-stranded RNA". *Curr Opin Cell Biol* (2001); 13:244-8.

5. Wargelius A, Ellingsen S, Fjose A. Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263:156-61.

6. Li YX, Farrell MJ, Liu R, Mohanty N, Kirby ML. Double-stranded RNA injection produces null phenotypes in zebrafish. *Dev Biol* (2000); 217:394-405.

7. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. *Nature* 1997; 387:83-90.

8. Acosta J, Carpio Y, Borroto I, González O, Estrada MP. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *Journal of Biotechnology* (2005), 119(4): 324-31.

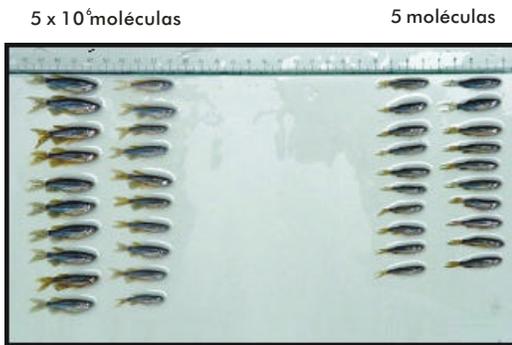


Figura 2. Características fenotípicas de los peces microinyectados con ARNdc (M) comparados con sus controles (C). Los peces microinyectados con ambas dosis de ARNdc muestran un desarrollo normal.

En los mamíferos, la inhibición del gen que codifica para la miostatina mediante múltiples vías produce fenotipos con un incremento en el peso corporal debido a la hiperplasia, la hipertrofia o a la combinación de ambas. En los peces, específicamente en el pez cebra transgénico que expresa altos niveles del propéptido de la miostatina, se observa un incremento en el número de miofibrillas del músculo esquelético; sin embargo, este no presenta diferencias significativas en la talla de las fibras [9].

Para determinar si el incremento de la masa muscular esquelética observado en los peces microinyectados con ARNdc específico para la miostatina, se debió a la hiperplasia o a la hipertrofia de la fibra muscular, se realizó un análisis histológico del músculo esquelético. El número de fibras en un área específica se determinó por el conteo de estas.

Como resultado, el número promedio de fibras de los peces microinyectados con 5 moléculas de ARNdc ( $54.06 \pm 9.72$ ; promedio  $\pm$  desviación estándar), fue significativamente superior al número de fibras en los animales controles ( $44.25 \pm 7.27$ ). Este incremento del número de fibras en un área determinada demuestra un crecimiento hiperplásico de las fibras musculares como resultado del silenciamiento de la miostatina por la microinyección del ARNdc (Figura 3).

En el análisis de los peces microinyectados con  $5 \times 10^6$  moléculas de ARNdc, el promedio del número de fibras de los animales controles ( $40.81 \pm 7.33$ ) a un área fijada fue significativamente mayor que el promedio del número de fibras de los animales microinyectados con ARNdc ( $27.43 \pm 4.56$ ). El promedio del área de las fibras individuales se incrementó en 48.7% en los peces microinyectados con ARNdc con respecto a los controles negativos. El hecho de que en los peces microinyectados con ARNdc el número de fibras musculares en un área determinada haya sido significativamente inferior con respecto a los controles negativos, refleja un incremento en el diámetro de las fibras, lo cual indica hipertrofia. Es importante señalar que el número de fibras en los controles negativos de ambas dosis no mostró diferencias significativas en el número de fibras musculares (Figura 4).

Finalmente, para demostrar a nivel molecular que el fenotipo observado fue el resultado del silenciamiento de la miostatina, se realizó una reacción de transcripción

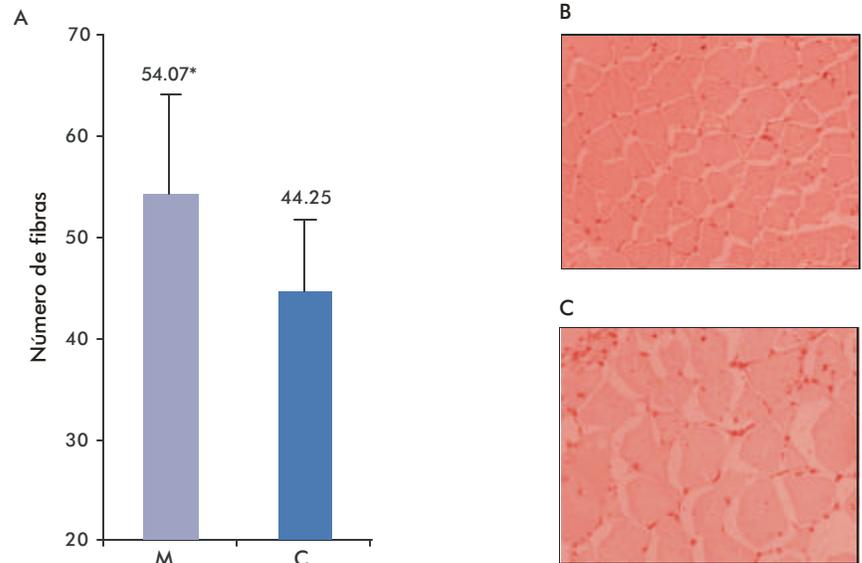


Figura 3. Efecto de la microinyección de ARNdc sobre el número de fibras musculares. (A) Número de fibras promedio en un área determinada en los animales microinyectados (M) con 5 moléculas de ARNdc comparado con sus controles (C). Tinción con hematoxilina-eosina de corte transversal en animales microinyectados (B) y controles (C). \* Indica que hay diferencias significativas.

reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR, siglas en inglés) semicuantitativa utilizando el gen Max como control de la eficiencia del PCR. Para este experimento se utilizó la dosis más alta de ARNdc. El RT-PCR mostró una drástica reducción en el ARNm de la miostatina del pez cebra en los embriones microinyectados con ARNdc de 24 hpf comparado con los embriones controles (Figura 2).

9. Xu C, Wu G, Zohar Y, Du S. "Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. The Journal of Experimental Biology (2003); 206:4067-79.

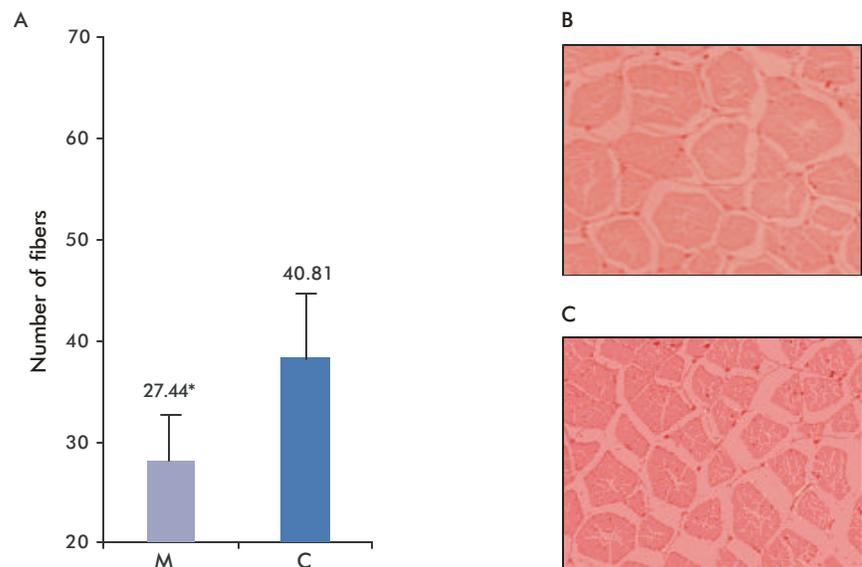


Figura 4. Efecto de la microinyección de ARNdc sobre el número de fibras musculares. (A) Número de fibras promedio en un área determinada para los animales microinyectados (M) con  $5 \times 10^6$  moléculas de ARNdc, comparado con sus controles (C). Tinción con hematoxilina-eosina de corte transversal en animales microinyectados (B) y controles (C). \* Indica que hay diferencias significativas.

La tecnología del ARN de interferencia empleada para silenciar el gen de la miostatina en el pez cebra provocó un incremento drástico de la masa muscular, debido a hiperplasia o hipertrofia de las fibras musculares. La tecnología del ARN de interferencia, constituye un suplemento muy importante para los métodos ya existentes para el estudio de la función génica en el pez cebra y en peces en general. Estos resultados sugieren, además, que las moléculas que bloqueen la actividad de la miostatina pueden constituir agentes muy útiles para incrementar la masa muscular en especies de importancia para la acuicultura.

#### Clonaje y caracterización del ADN complementario de la hormona hiperglicémica de *Litopenaeus schmitti*. Análisis funcional mediante la técnica de ARN de interferencia

La hormona hiperglicémica (CHH) del camarón blanco del Caribe, *Litopenaeus schmitti*, es la primera hormona de la glándula sinusal de un camarón del Océano Atlántico caracterizada hasta la fecha [10]. Su secuencia aminoacídica fue dilucidada por combinación de degradación automática de Edman, digestión enzimática y espectrometría de masa [10]. Las CHH se sintetizan fundamentalmente en el pedúnculo ocular y se caracterizan por expresarse a diferentes niveles durante el desarrollo de las gónadas [10]. La actividad fundamental de la CHH es mantener la homeostasia de la glucosa en la hemolinfa con un ritmo circadiano de esta. Esto ocurre mediante un proceso de degradación del glucógeno en diferentes órganos [11]. Esta hormona, además de su función primaria en la regulación energética en los crustáceos, participa en la reproducción, la muda, la osmorregulación y el metabolismo de los lípidos en diferentes especies, entre otras importantes funciones [12]. La familia de la CHH es exclusiva del grupo de los artrópodos y el alineamiento entre las secuencias aminoacídicas de sus miembros para una misma especie y entre especies diferentes muestra un alto porcentaje de homología. Esta característica ha permitido el diseño de oligonucleótidos degenerados, a partir de las regiones conservadas entre las hormonas para el aislamiento de los genes que codifican para esta familia de neuropéptidos. Las metodologías que se desarrollan a escala mundial, con el objetivo de mejorar las técnicas actualmente empleadas en la industria camaronera para lograr la reproducción en condiciones de cultivo, van dirigidas fundamentalmente hacia el estudio de la regulación de los genes que codifican para los miembros de la familia de la hormona hiperglicémica de crustáceos. Las especies más estudiadas han sido crustáceos decápodos; sin embargo, no existen antecedentes en el camarón blanco del Caribe, *L. schmitti*. En este trabajo se aísla, clona y caracteriza por primera vez el ADN complementario ADNc de la CHH del camarón del Océano Atlántico, *L. schmitti*. Constituye, además, la primera evidencia de que la técnica del ARNi es funcional en camarones adultos *in vivo*.

Con el objetivo de aislar mediante PCR el gen que codifica para el péptido maduro de la CHH de *L. schmitti*, se diseñaron dos oligonucleótidos dege-

Aislamiento y clonaje del ADNc de la CHH de *Litopenaeus schmitti* utilizando oligonucleótidos degenerados

Caracterización de la expresión de la CHH en diferentes tejidos

Supresión *in vivo* de la expresión del gen de la CHH por inyección intra-abdominal de ARNdc

Determinación del efecto del ARNdc sobre la actividad hiperglicémica de la CHH (Ensayo oxidación de glucosa)

Figura 5. Procedimiento experimental para la obtención y ensayo de ARNdc de interferencia contra el gen de la CHH del camarón del Océano Atlántico, *Litopenaeus schmitti*.

nerados, a partir de la secuencia aminoacídica de la hormona hiperglicémica de crustáceos de esta especie [10]. Utilizando estos cebadores fue posible amplificar satisfactoriamente el ADNc de la CHH, como se muestra en la figura 6.

Con el objetivo de determinar el grado de homología que existe entre la secuencia nucleotídica obtenida para el gen que codifica para la CHH de *L. schmitti* y las secuencias nucleotídicas reportadas en la literatura para este gen en camarones peneidos, se hizo un alineamiento de secuencias mediante el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw>). El mayor porcentaje de identidad (89%) se obtuvo con la secuencia nucleotídica del gen de la CHH de *Marsupenaeus japonicus*. Se obtuvo más de 70% de identidad con otras CHH del pedúnculo ocular de los camarones *Penaeus monodon* (80%), *Metapenaeus ensis* (77%) y *Litopenaeus vannamei* (73%) (Figura 1 en [13]). La

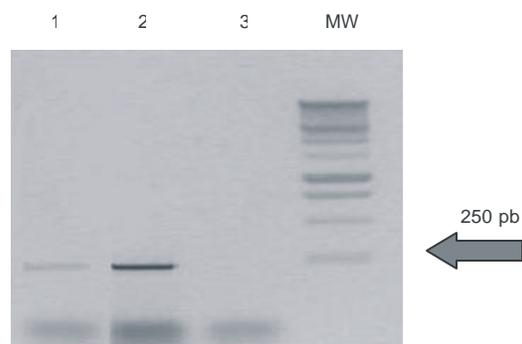


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) que muestra los resultados de las reacciones de RT-PCR, realizadas con el objetivo de amplificar el gen que codifica para la CHH de *L. schmitti*.

Carril 1. Carril 1. Reacción de RT-PCR utilizando como templado 5  $\mu$ g de ARN total de Pedúnculo ocular de *L. schmitti*.

Carril 2. Carril 2. Reacción de RT-PCR utilizando como templado 10  $\mu$ g de ARN total de Pedúnculo ocular de *L. schmitti*.

Carril 3. Carril 3. Control negativo (PCR sin molde).

Carril M. Marcador de pesos moleculares 1kb ADN Ladder (Promega, USA).

10. Huberman A, Aguilar MB, Navarro-Quiroga I, Ramos L, Fernández I, White FM, Hunt DF, Shabanowitz J. A hyperglycemic peptide hormone from the Caribbean shrimp *Penaeus (litopenaeus schmitti)*. *Peptides* 2000; 21:331-8.

11. Mettulo R, Edomi P, Ferrero EA, Lorenzon S, Giulianini PG. The crustacean hyperglycemic hormone precursors a and b of the Norway lobster differ in the pre-hormone but not in the mature peptide. *Peptides* 2004; 25:1899-907.

12. Chen SH, Lin CY, Kuo CM. Cloning of two crustacean hyperglycemic hormone isoforms in freshwater giant prawn (*Macrobrachium rosenbergii*): evidence of alternative splicing. *Mar Biotechnol* (NY) 2004; 6:83-94.

se-cuencia aminoacídica deducida para el ADNc de la CHH de *L. schmitti* [10]. Esta posee 72 residuos de aminoácidos y 6 residuos de cisteínas en la misma posición que otras CHH de camarones peneidos (Figura 1 [13]).

La talla y la expresión del ARN mensajero de la CHH en los diferentes tejidos se determinaron mediante análisis de Northern blot de ARN total aislado de pedúnculo ocular, músculo y estómago de *L. schmitti*. A una membrana de nitrocelulosa se transfirió igual cantidad (10 µg) de cada muestra de ARN. Para estos ensayos se utilizó como sonda radioactiva el ADNc correspondiente al péptido maduro de la CHH del órgano X del pedúnculo ocular de *L. schmitti*. Para corroborar la calidad de las muestras de ARN, se hibridó la misma membrana de nitrocelulosa con el ADNc de la beta actina y su transcrito se observó como una banda definida en todas las muestras de ARN analizadas. La expresión del ARN mensajero de la CHH del órgano X del pedúnculo ocular se observó en pedúnculo ocular, pero no en músculo y estómago. La talla estimada para el transcrito de la CHH fue de 1 kb (Figura 2 en [13]). Estos resultados están acordes con los reportados en la literatura, que describen al complejo pedúnculo ocular-órgano X-glándula sinusal como la principal fuente de síntesis de la familia de péptidos de la CHH [15]. Están en correspondencia, además, con los reportes que muestran al pedúnculo ocular como la única estructura que produce la forma traducida de la CHH del órgano X, excepto el órgano pericárdico, que produce variantes alternativas de la CHH traducida.

Además, se determinó la expresión de la CHH en los tejidos mediante RT-PCR, utilizando cebadores específicos para la CHH. Se amplificó un fragmento de ADN a la talla esperada a partir de pedúnculo ocular y estómago, y otro fragmento de menor intensidad en músculo (Figura 2 en [13]). Estos resultados sugieren una expresión baja-diferencial de la CHH en los tejidos del estómago, que pudiera depender del estado de muda. La banda débil observada en músculo, sugiere un patrón de expresión similar al observado en el estómago.

Para investigar la habilidad del ARNdc de interrumpir la función génica de la CHH en camarones adultos, se utilizó como templado para la síntesis *in vitro* del ARNdc, el ADN complementario (ADNc) que codifica para el péptido maduro de la CHH (Figura 7). El grupo al que se le inyectaron 20 µg del ARNdc de la CHH en la cavidad abdominal mostró, un decrecimiento significativo ( $p < 0.05$ ) de la concentración de glucosa en hemolinfa (una disminución del 43%) 24 horas después de la inyección (Figura 3 en [13]).

Para demostrar la especificidad de mecanismo de silenciamiento génico mediante ARNdc, se incluyó un grupo de camarones que fueron inyectados con 20 µg de un ARNdc no relacionado con el ARN mensajero de la CHH. El ARNdc no relacionado se sintetizó a partir de un transcrito aislado del estómago del camarón *L. schmitti* que codifica para una proteína homóloga a la quitinasa. Como se esperaba, este grupo experimental no mostró una disminución significativa de la concentración de glucosa en hemolinfa ( $p > 0.05$ ) (Figura 3 en [13]); es decir, la actividad hiperglicémica de la CHH no fue afectada. Se corroboró, además, el silenciamiento del gen no relacionado a la CHH, 24 horas después del

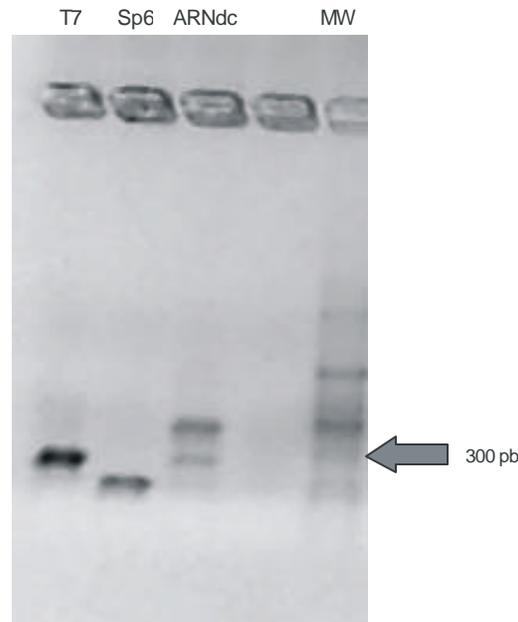


Figura 7. Síntesis *in vitro* del ARNdc para la CHH de *Litopenaeus schmitti*. T7: síntesis de la primera cadena de ARN con el oligonucleótido T7, Sp6: síntesis de la segunda cadena de ARN con el oligonucleótido Sp6, ARNdc: formación del híbrido doble cadena. MW. Marcador de pesos moleculares de ARN.

tratamiento, mediante Northern blot, para demostrar que su mecanismo de silenciamiento había transcurrido adecuadamente. En la mezcla de ARN total de estómago de los camarones del grupo control, a los cuales se les inyectó igual volumen de solución salina, se observó una señal definida a la talla esperada (500 pb). No se observó señal en las muestras de ARN total de estómago correspondientes a los camarones tratados con el ARNdc no relacionado con la CHH. Ello evidencia que el mecanismo de silenciamiento génico había transcurrido satisfactoriamente a nivel transcripcional (Figura 4 en [13]).

El silenciamiento del gen de la CHH fue además comprobado mediante análisis de Northern blot y RT-PCR semicuantitativo. Los camarones de cada grupo experimental se sacrificaron 24 horas después de los tratamientos y se les removió el pedúnculo ocular para extraer el ARN total. Se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa igual cantidad (20 µg) de cada muestra de ARN total.

Los análisis de *Northern blot* utilizando como sonda radioactiva el ADNc de la CHH amplificado por PCR, mostraron una señal definida a la talla esperada de 1 kb en el ARN total de pedúnculo ocular de los camarones tratados con solución salina. En las muestras de ARN total de pedúnculo ocular correspondientes a los camarones tratados con el ARNdc de la CHH no se observó señal (Figura 5 en [13]), lo cual demostró que el ARNdc fue capaz de silenciar completamente el gen de la CHH. En la misma membrana de nitrocelulosa donde se transfirieron las muestras de ARN de pedúnculo ocular, los niveles del transcrito de la CHH se compararon con los de  $\beta$  actina (gen de expresión ubicua, no relacionado con el gen de la CHH). El transcrito de la  $\beta$  actina se observó como una banda

13. Lugo JM, Morera Y, Rodríguez T, Huberman A, Ramos L, Estrada MP. Molecular cloning and characterization of the crustacean hyperglycemic hormone cDNA from *Litopenaeus schmitti*. Functional analysis by double-stranded RNA interference technique. FEBS J 2006; 273: 5669-77.

14. Keller R. Crustacean neuropeptides: structures, functions and comparative aspects. Experientia 1992; 48:439-48.

15. Dirksen H, Bocking D, Heyn U, Mandel C, Chung JS, Baggerman G, Verhaert P, Daufeldt S, Plosch T, Jaros PP, Waelkens E, Keller R, Webster SG. Crustacean hyperglycaemic hormone (CHH)-like peptides and CHH-precursor-related peptides from pericardial organ neurosecretory cells in the shore crab, *Carcinus maenas*, are putatively spliced and modified products of multiple genes. Biochem J (2001); 356:159-70.

definida en todas las muestras de ARN total de pedúnculo ocular analizadas. Este resultado evidenció una vez más que el mecanismo de silenciamiento génico estaba ocurriendo de manera blanco-específico (Figura 5 en [13]).

Resultados similares se obtuvieron en los ensayos de RT-PCR semicuantitativos. Se observó un fragmento de ADN definido de 216 pares bases, correspondiente al ARNc de la CHH, solamente a partir de las muestras de ARN total de los camarones tratados con solución salina (Figura 6 en [13]). Como se esperaba, se amplificó un fragmento de ADN correspondiente al gen de la  $\beta$  actina, a partir de todas las muestras de ARN total de pedúnculo ocular analizadas (Figura 6 [13]).

Con estos resultados se corroboró que la inyección del ARNc de la CHH es capaz de suprimir de manera específica el gen de la CHH, teniendo en cuenta que la inyección del ARNc no relacionado al gen de la CHH, no provocó una disminución de los niveles de glucosa en hemolinfa, además de que no se observó una supresión del gen de la  $\beta$  actina después de la inyección de las construcciones genéticas de ARNc.

Nuestros resultados muestran por primera vez, que la inyección abdominal de ARNc puede utilizarse para producir el fenómeno de ARN interferencia y causar silenciamiento génico en camarones adultos *in vivo*.

### Novedad científica del trabajo

Estos estudios son pioneros en el país y de gran novedad para la ciencia a nivel mundial. Demuestran la potencialidad del mecanismo de ARNi y de su capacidad para demostrar funciones génicas y conceptos, que puedan generar nuevos productos biotecnológicos para su aplicación en los diferentes campos de la investigación, o generar información para el diseño de nuevos fármacos.

La tecnología del ARN interferencia empleada para silenciar el gen de la miostatina en pez cebra, provocó un incremento dramático de la masa muscular, debido a hiperplasia o hipertrofia de las fibras musculares.

Con este trabajo se demostró que la tecnología del ARN interferencia constituye un suplemento muy importante para los métodos ya existentes para el estudio de la función génica en peces. Nuestros resultados sugieren además que moléculas que bloqueen la actividad de la miostatina pueden ser muy útiles para incrementar la masa muscular en especies de importancia para la acuicultura.

Se aisló y secuenció por primera vez el gen de la hormona hiperglicemiante del camarón del Océano Atlántico, *L. schmitti*. Estos resultados muestran por primera vez que la inyección abdominal de ARNc puede utilizarse para producir el fenómeno de ARN interferencia y causar silenciamiento génico en camarones adultos *in vivo*. Estos hallazgos pudieran convertirse en una herramienta poderosa para el estudio de las funciones génicas en crustáceos.

Por primera vez se emplea con éxito en Cuba la técnica de ARN interferencia para el estudio de la función génica en organismos acuáticos.

El resultado tiene un gran impacto en la Biotecnología Acuática, debido a que se caracteriza la función de genes que podrían resultar interesantes, no solo desde el punto de vista científico sino también productivo.

### Conclusiones

1. El mecanismo de ARN de interferencia es útil para estudiar funciones génicas en peces y crustáceos.
2. El silenciamiento del gen de la miostatina, en pez cebra, mediado por ARN interferencia, produce un incremento drástico de la masa muscular debido a hiperplasia o hipertrofia de las fibras musculares, demostrándose la función de la miostatina en pez cebra como regulador negativo del crecimiento muscular.
3. El silenciamiento del gen de la CHH, en camarón, mediado por ARN interferencia, produce una disminución significativa de los niveles de glucosa en hemolinfa, demostrándose la función de la CHH en el metabolismo energético de *L. schmitti*.