



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO

TESIS DE MAGÍSTER EN CIENCIAS
CON MENCIÓN EN:
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL GEN
p53 DE *Litopenaeus vannamei* E IMPLEMENTACIÓN DE LA
TECNOLOGÍA DE LA EDICIÓN GENÓMICA TALEN PARA SU
MUTACIÓN DIRIGIDA**

MAX SALVATIERRA ALOR

TUMBES, PERÚ

2016



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
ESCUELA DE POSGRADO

TESIS DE MAGÍSTER EN CIENCIAS
CON MENCIÓN EN:
BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DEL GEN
p53 DE *Litopenaeus vannamei* E IMPLEMENTACIÓN DE LA
TECNOLOGÍA DE LA EDICIÓN GENÓMICA TALEN PARA SU
MUTACIÓN DIRIGIDA**

MAX SALVATIERRA ALOR

TUMBES, PERÚ
2016

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

Yo **Max Salvatierra Alor** declaro que los resultados reportados en esta tesis, son producto de mi trabajo con el apoyo permitido de terceros en cuanto a su concepción y análisis. Asimismo, declaro que hasta donde yo sé no contiene material previamente publicado o escrito por otra persona excepto donde se reconoce como tal a través de citas y con propósitos exclusivos de ilustración o comparación. En este sentido, afirmo que cualquier información presentada sin citar a un tercero es de mi propia autoría. Declaro, finalmente, que la redacción de esta tesis es producto de mi propio trabajo con la dirección y apoyo de mis asesores de tesis y mi jurado calificador, en cuanto a la concepción y al estilo de la presentación o a la expresión escrita.

MAX SALVATIERRA ALOR

ACTA DE REVISIÓN Y DEFENSA DE TESIS

RESPONSABLES

Max Salvatierra Alor

EJECUTOR

Emmerik Motte Darricau, Ph.D.

ASESOR

Dr. Eric Mialhe Matonnier

CO - ASESOR

JURADO DICTAMINADOR

Dr. Auberto Hidalgo Mogollón

PRESIDENTE

Dr. Eric Mialhe Matonnier

SECRETARIO

Dra. Virna Cedeño Escobar

VOCAL

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.	x
ABSTRACT.	xi
1. INTRODUCCIÓN	12
2. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA.	14
2.1. Antecedentes	14
2.2. Bases teórico-científicas	19
2.3. Definición de términos básicos	22
3. MATERIAL Y MÉTODOS.	25
3.1. Localidad y período de ejecución	25
3.2. Población muestreo y muestra	25
3.3. Animales y condiciones de aclimatación	25
3.4. Colección de la muestra	25
3.5. Obtención y construcción de los vectores de expresión	26
3.6. Diseño y construcción de los TALENs	27
3.7. Transformación y purificación de plásmidos	28
3.8. Extracción de ADN genómico	29
3.9. Extracción del ARN total	29
3.10. Síntesis de ADNc	29
3.11. Diseño de iniciadores	30
3.12. Amplificación por PCR	30
3.13. Secuenciación de amplicones	31
3.14. Ensayo de estrés térmico	31
3.15. Análisis de la expresión del gen Lvp53	32
3.16. Ensayo de transfección de pCMV-GFP en langostinos	32
3.17. Preparación del plásmido/transfectante	33
3.18. Análisis de la expresión del gen reportero EGFP	34
3.19. Detección por microscopía confocal	34
3.20. Ensayo de mutagénesis dirigida al gen Lvp53	35
3.21. Evaluación citológica	35
3.22. Procesamiento y análisis de datos	36

4. RESULTADOS.	38
4.1. Caracterización parcial del gen p53	38
4.2. Análisis de secuencias de Lvp53	39
4.3. Caracterización de la región exónica e intrónica	40
4.4. Análisis de polimorfismos	42
4.5. Sitios reguladores	44
4.6. Respuesta del gen Lvp53 a un estrés por temperatura	46
4.7. Respuesta del gen p53 al shock térmico	47
4.8. Implementación de metodología de transfección	48
4.9. Análisis de expresión del gen reportero EGFP	49
4.10. Ensayo por microscopia confocal	51
4.11. Identificación de regiones blanco de TALENs en el gen Lvp53	54
4.12. Construcción de los plásmidos TALENs	55
4.13. Evaluación de las mutaciones	57
4.14. Análisis citológico de los hemocitos	58
5. DISCUSIÓN.	60
6. CONCLUSIONES.	71
7. RECOMENDACIONES.	72
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	73

RESUMEN

El gen Lvp53 del langostino *Litopenaeus vannamei* (Lvp53) ha sido caracterizado a nivel del ADN complementario (ADNc), encontrando motivos homólogos a p53 de humanos y relación con la respuesta a diferentes tipos de estrés. Sin embargo, aún se desconoce la estructura de este gen, así como su funcionalidad. En este estudio se propuso caracterizar parcialmente la secuencia genómica del gen Lvp53, estudiar su expresión ante un estrés térmico e implementar metodologías de transfección *in vivo* y mutagénesis dirigida mediada por TALENs para determinar la relación entre la pérdida de la actividad de Lvp53 con el ciclo celular. Se identificaron dos regiones intrónicas putativas con posibles sitios funcionales de Lvp53. Se observó regulación positiva de la expresión del transcrito ante variaciones de temperatura alcanzando mayores niveles cuando ésta es incrementada. Además, se evaluó una metodología de transfección de hemocitos *in vivo*, que resultó en una muy baja eficiencia de expresión del vector. Finalmente, se diseñaron, sintetizaron y evaluaron plásmidos codificantes de TALENs dirigidos a dos sitios importantes dentro del gen Lvp53, aunque no se observaron eventos de mutagénesis en hemocitos. En conclusión, no se pudo demostrar el efecto de la mutación en Lvp53, pero sí caracterizar la estructura parcial y función del gen Lvp53.

Palabras clave: Lvp53, intrón, estrés térmico, transfección, TALENs, mutagenesis dirigida.

ABSTRACT

Litopenaeus vannamei white shrimp p53 gene (Lvp53) has been characterized at cDNA level, showing homologous motifs to human p53 with a likeness concerning the response to different types of stress. However, the structure of this gene as well as its functionality is still unknown. In this study, it was proposed to characterize partially the genomic sequence of Lvp53 gene, analyzing its expression in response to a thermal stress, and to implement methods of *in vivo* transfection and site-directed mutagenesis mediated by TALENs to determine the relationship between the loss of Lvp53 activity and cell cycle. Two putative intronic regions were identified with possible functional sites from Lvp53 gene. It was also found an upregulated expression under temperature variations, reaching higher levels when it is incremented. Furthermore, a method of *in vivo* hemocytes transfection was assessed, resulting in a very low efficiency of vector expression. Finally, two plasmids encoding TALENS that target important sites within the Lvp53 gene were designed, synthesized and assessed, although no mutagenesis events were observed in hemocytes. In conclusion, it was not demonstrated the effect of the mutation in Lvp53, but the partial structure and function of the gene Lvp53 were characterized.

Key words: Lvp53, intron, thermal stress, transfection, TALENs, directed mutagenesis.

1. INTRODUCCIÓN

El langostino blanco *Litopenaeus vannamei* es una especie muy importante para la acuicultura mundial y peruana, siendo su cultivo un pilar fundamental de la economía de la región norte del país. Numerosos estudios sobre los aspectos de la biología del langostino ya han sido realizados y el conocimiento adquirido ha permitido la implementación de estrategias para el mejoramiento de su cultivo. De esta manera, se ha comenzado a apostar por la investigación con el interés de dar solución a los problemas que atraviesa el sector acuícola en especial sobre esta especie.

Las investigaciones se han centrado principalmente en el estudio de las patologías que afectan el cultivo y los mecanismos de defensa a diferentes tipos de estrés. Gracias al desarrollo de nuevas tecnologías como los sistemas de ARN de interferencia (ARNi), secuenciamiento de última generación (NGS por sus siglas en inglés), vacunas recombinantes o la manipulación genética se ha logrado identificar diferentes genes de interés además de generar estrategias de protección al langostino. La edición genómica es una tecnología reciente, que ha sido aplicada en una gran cantidad de especies con gran eficiencia en la inducción de mutaciones de interés dirigidas a un gen blanco para el estudio funcional del gen o la obtención de organismos genéticamente modificados.

Por otro lado, el gen Lvp53 del langostino ha empezado a ser estudiado hace pocos años, encontrando relación con los mecanismos de respuesta celular frente a un estrés de tipo biótico y abiótico. Además, se ha encontrado la presencia de motivos conservados en muchas especies lo que sugiere un rol similar a los reportados sobre la proteína supresora de tumores p53 de humanos tales como la activación de la apoptosis y el control del ciclo celular. Esto abriría la posibilidad de manipular el ciclo celular a través de esta proteína para el estudio de procesos celulares o para buscar la obtención de células inmortalizadas, lo cual permitiría la obtención de la primera línea celular de langostino.

Sin embargo, aún se desconocen aspectos importantes de la estructura y la funcionalidad del gen Lvp53 en particular, su expresión y rol en las células. Dicho conocimiento permitiría utilizarlo como modelo para el diseño de metodologías y estrategias dirigidas al estudio de otros genes importantes para el mejoramiento del langostino. Una limitante adicional corresponde a la falta de metodologías eficientes de transfección *in vivo* y sistemas de mutagénesis dirigida para poder complementar los estudios funcionales de este gen y otros de interés en el langostino.

En el presente trabajo se ha estudiado la organización del gen Lvp53 de manera parcial, se han caracterizado algunos fragmentos de interés, y se ha evaluado el comportamiento de este gen en respuesta al estrés térmico. Igualmente, se evaluaron metodologías de transfección *in vivo* de hemocitos así como del sistema de mutagénesis dirigida basado en TALEN. Los resultados obtenidos serán útiles para complementar la información que se tiene del gen Lvp53 y contribuir con el establecimiento de metodologías de ingeniería genética en langostinos.

2. MARCO DE REFERENCIA DEL PROBLEMA.

2.1 Antecedentes.

Una de las áreas más importantes dentro del rubro productivo es la acuicultura, la cual posee un gran potencial de crecimiento y generación de muchos puestos de trabajo, con el fin de mejorar la nutrición humana (Mathiesen 2012). El langostino blanco *Litopenaeus vannamei* es una de las especies más explotadas en la acuicultura y es un recurso clave de la producción en el Perú con fines de exportación (Mathiesen 2012; Mendoza 2011). Debido a la gran demanda mundial, se han realizado varias investigaciones que puedan beneficiar su producción. Sin embargo, existen algunos factores bióticos y abióticos causantes de enfermedades en el langostino (Flegel *et al.* 2008; Karunasagar and Ababouch 2012), que afectan su producción. Adicionalmente, los langostinos son animales muy sensibles al estrés por cambios de las condiciones ambientales, en consecuencia, se han realizado muchas investigaciones para entender la biología, la patología y los mecanismos respuesta al estrés en el langostino.

Uno de los factores abióticos que afectan el cultivo de los langostinos es la temperatura del agua. A bajas temperaturas ha sido reportada una variación de los aminoácidos libres en diferentes tejidos indicando un cambio en el balance de la degradación y síntesis de proteínas, (Zhou, Wang, and Xian 2011). También se ha observado una disminución de hemocitos, y un incremento en la tasa de apoptosis celular (Chang, Yeh, and Cheng 2009). De igual forma se ha observado un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los hemocitos del langostino cuando se bajó de 26°C a 20°C; por otro lado, cuando se disminuyó a 17°C la temperatura, se observó una reducción en el conteo de hemocitos, un aumento de la actividad de la caspasa 3 y de la tasa apoptótica (Li *et al.* 2014).

De manera similar el incremento de temperatura también genera cambios tales como el aumento de la producción de ROS (Madeira *et al.* 2013), un incremento de los niveles de las proteínas de choque térmico constitutivas e inducibles desde las primeras horas (Qian *et al.* 2012). De igual manera, otros genes codificantes de las proteínas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión

transferasa, glutatión peroxidasa y la óxido nítrico sintasa variaron su expresión observándose cambios en la osmolalidad cuando la temperatura varió (Zhu and Yao 2015; Zhou *et al.* 2010; Qiu *et al.* 2011).

Estos factores entre otros afectan a células como hemocitos, motivo para conseguir una línea celular que permita un estudio válido y controlado. Anteriormente, se ha conseguido establecer sólo cultivos primarios mediante la utilización de diferentes medios de cultivo y suplementos (Itami *et al.* 1999; Jiang *et al.* 2006; Geroge and Dhar 2010). Algunos autores intentaron establecer líneas celulares en crustáceos mediante la inserción de oncogenes humanos (Claydon and Owens 2008) y oncogenes virales en langostinos (Tapay *et al.* 1995; Hu, Wang, and Chen 2010; Hu *et al.* 2008; Claydon, Roper, and Owens 2010) pero ninguna investigación ha reportado la obtención exitosa de una línea celular en langostinos.

Uno de los genes relacionados con la respuesta al estrés térmico es el gen p53, del cual ya se han realizado diversas investigaciones relacionadas a su estructura y su función. La caracterización de su secuencia en especies como ratones, ha permitido la identificación de una estructura génica similar a los humanos, sin embargo, el tamaño del gen es solo 12 Kb (Zakut-Houri *et al.* 1983; Bienz *et al.* 1984). En peces se ha encontrado una similar organización del gen, con 11 exones y 10 intrones, también se ha reportado la existencia de un evento de “splicing” clásico y alternativo en peces debido a la presencia de un polimorfismo ubicado en el intrón del gen p53 del pez cebra, el cual afecta el tamaño del ARNm y la cantidad de la proteína producida (Piasecka *et al.* 2015).

A su vez en invertebrados se ha reportado la presencia de un solo miembro de la familia de proteínas homólogas a p53, la cual comparte una alta homología con los vertebrados en el dominio de unión al ADN pero gran variabilidad en el resto de regiones (Ou *et al.* 2007; Priami *et al.* 2015). Además, se ha reportado que el gen p53 de *Drosophila melanogaster*, Dmp53, posee 10 exones y los tamaños de sus exones e intrones son muy distintos a los reportados en vertebrados (Khoury and Bourdon 2010). *Caenorhabditis elegans* tiene un gen

homólogo a p53, denominado CEP-1, el cual posee 13 exones y 12 intrones. Una búsqueda en el NCBI demostró que *Cassostrea gigas*, el gen posee 14 exones y 13 intrones confirmando la variedad en la organización génica entre diferentes especies.

El estudio de mutaciones en intrones del gen p53 en humanos, como especie representante de los vertebrados, ha sido relacionado con la presencia de enfermedades tales como lesiones en la gastritis debido a la combinación de polimorfismos en los intrones (Sadeghi *et al.* 2013), que pueden afectar a la estructura o funcionalidad de la proteína (Trejo-Becerril *et al.* 2000), dar origen al cáncer de células escamosas (Thongsuksai *et al.* 2010) o eventos de retención aberrante de intrones por “splicing” alternativo que conduce al origen de algunos tipos cáncer como de pulmón (Takahashi *et al.* 1990; Boldrini *et al.* 2008; Costa *et al.* 2008). Por otro lado, debido al efecto de algunas mutaciones en los intrones de este gen, se han reportado nuevas isoformas con actividad anti-apoptótica que se expresa en respuesta al daño ocurrido en la embriogénesis de peces (Shi *et al.* 2015). Esto indica una asociación de mutaciones en el gen p53 con el establecimiento de líneas celulares a partir de células de adenocarcinoma endometrial humano (Isaka 2003), células escamosas de carcinoma de laringe (Wu *et al.* 2013), células de tejido adiposo y células cartilaginosas de ratón (Kamiya *et al.* 2002; Komine *et al.* 2012) entre otros.

En invertebrados como hidras, moluscos, insectos y nematodos (Farcy *et al.* 2009; Jessen-Eller *et al.* 2002; Broodsky *et al.* 2000; Moser *et al.* 2009) se mostró la participación de la proteína p53 principalmente en la vía de activación de la apoptosis como respuesta a daños en el ADN, en la reparación del ADN y en la detención del ciclo celular. Además, en *Drosophila* está relacionada al incremento de la esperanza de vida (Bauer *et al.* 2005).

La relación de la temperatura con la expresión del gen p53 ha sido demostrada en moluscos, donde se reportó una sobreexpresión ante una variación de la temperatura (Yao and Somero 2013), aunque hay estudios que afirman que esta proteína no varía (Farcy *et al.* 2009). En larvas del pez cebra, de

igual manera, se ha observado un aumento de la expresión de genes de la vía de señalización de p53 y una disminución de su expresión en respuesta a un incremento o reducción de la temperatura, respectivamente (Long *et al.* 2012). Y en salmón se ha reportado la sobre expresión de genes regulados por p53 frente a un estrés térmico (Tomalty *et al.* 2015).

En langostinos hay una limitada información acerca de la estructura del gen p53. Hace unos años se caracterizó por primera vez el gen Lvp53 perteneciente a la especie *Litopenaeus vannamei*, y se ubicó en un grupo filogenético claramente separado de otras especies, solo compartiendo gran homología con la secuencia de *M. japonicus*. Además, se caracterizó el ORF del gen y los UTRs detectando también niveles de expresión variables en diferentes tejidos y una marcada sobreexpresión ante el estrés por pH y cadmio (Qian *et al.* 2014). Posteriormente se reportó una expresión incrementada de Lvp53 inducida por LvRac1 (Cha *et al.* 2015) y una regulación negativa por un microARN denominado miR-1000-p53, reportado en *M. japonicus* ante una infección por WSSV (Gong, Ju, and Zhang 2015). Sin embargo, se desconoce acerca de información de las secuencias intrónicas del gen Lvp53 y su posible influencia sobre la funcionalidad del gen.

Por otro lado, en las últimas décadas se han desarrollado metodologías de transfección con resultados exitosos en investigaciones básicas y aplicadas en diferentes especies. En langostinos se han realizado comparaciones entre diferentes metodologías de transfección para determinar la más adecuada. La aplicación de la biolística y la microinyección en embriones han sido exitosos en expresar la proteína (Liu *et al.* 2001; Yazawa *et al.* 2005). También se ha utilizado la electroporación, la cual, a pesar de ser eficiente en la obtención de la expresión recombinante, generó una baja tasa de sobrevivencia de los embriones y una distribución en mosaico (Tseng *et al.* 2000). Posteriormente, se variaron las metodologías para realizar la transfección en los gametos directamente y con estos obtener organismos portadores del gen recombinante (Li and Tsai 2000), mejorando la tasa de transfección y de sobrevivencia.

Los agentes químicos han prevalecido en este último modelo. Calderón (2004) concluyó que los agentes Effectene y JetPEI son los más eficientes en embriones de langostino *L. vannamei* y en artemia. Se ha demostrado que la transfección con jetPEI generó mejores resultados al ser contrastados con los obtenidos por microinyección o la electroporación (Sun *et al.* 2005). En los años siguientes, se realizaron investigaciones en las cuales se transfectaron langostinos *in vivo* utilizando Cellfectin mediante una inyección en el músculo del langostino (Dhar *et al.* 2007). También se han realizado transfecciones en cultivo de hemocitos, de gametos y de tejido linfoide de *P. monodon*, pero sólo fueron efectivas para los cultivos de gametos (Jose 2011).

Las moléculas de ARN también han sido transfectadas en langostinos, utilizando Lipofectamine obteniéndose una introducción eficiente de ARNs pequeños de interferencia (Li, Yan, and Song 2010; Prapavorarat *et al.* 2010) y de ARN de doble cadena para bloquear la traducción de una proteína de WSSV (Ahanger *et al.* 2014). Otros autores han utilizado reactivos alternos como Cellfectin para introducir ARNs pequeños de interferencia (Chang *et al.* 2012). Además, se ha demostrado que adicionalmente a la ligación del ARN con agentes transfectantes, éstos pueden ser inyectados directamente en animales o ser aplicados en cultivos celulares de manera directa, obteniendo en ambos casos alta eficiencia en la introducción del ácido nucleico y/o la expresión del gen (Leebonoi *et al.* 2015; Huang *et al.* 2015; Liu *et al.* 2016).

Finalmente, las metodologías de edición genómica, una revolución en el mundo científico, han demostrado la eficiencia de los TALENs, obteniendo exitosamente mutaciones de sitio dirigido en diferentes especies (Xiao *et al.* 2013; Sajwan *et al.* 2013; Hosoi *et al.* 2014, Zhang *et al.* 2013; Aryan *et al.* 2013; Moghaddassi, Eyestone, and Bishop 2014; Kawahara *et al.* 2016; Chen *et al.* 2016) y dos reportes en crustáceos (Hiruta *et al.* 2014; Naitou *et al.* 2014) utilizando de modelo la pulga de agua, *Daphnia*, sin embargo aún no se han reportado en langostinos.

2.2 Bases teórico científicas

Los estudios en langostino han sido enfocados en los hemocitos, ya que estas son células relacionadas con el sistema inmune del langostino (Tassanakajon *et al.* 2013), cumpliendo las actividades de encapsulación, fagocitosis y endocitosis ante infecciones por patógenos, así como en la producción y liberación de sustancias antivirales (Van de Braak *et al.* 2002; Rendon y Balcazar 2003; Aguirre-Guzmán *et al.* 2009; George *et al.* 2011). Además, en estas células poseen sistemas antivirales intracelulares mediados por proteínas y ARN de interferencia (ARNi) (Li *et al.* 2014; Huang and Zhang 2013).

Una proteína de interés que podría actuar en los hemocitos como un sistema de defensa es la codificada por el gen p53. Ésta es una proteína involucrada en un gran número de vías de señalización celular tales como la regulación del ciclo celular o la activación de la apoptosis en respuesta a daños en la secuencia del genoma o a diferentes estímulos de estrés (Vousden and Lu 2002). Además, p53 tiene como función ser supresor de tumores en humanos y muchas otras especies (Levine and Oren 2009; Donehower *et al.* 1995; Brož and Attardi 2010; Wei *et al.* 2005; Suman *et al.* 2009; Storer and Zon 2010), a través de la detención del ciclo celular o la activación de la apoptosis, lo cual evita el crecimiento celular sin control (Carstens *et al.* 2004).

El gen codificante de p53 está conservado en un amplio grupo de organismos, desde los mamíferos hasta los nematodos e insectos (Lu and Abrams 2006) y en humanos se agrupa con p63 y p73 en una misma familia de proteínas (Levrero *et al.* 2000). En murinos, este gen está regulado por un promotor de aproximadamente 1.7 Kb con elementos de regulación positiva y negativa de manera dependiente del ciclo celular (Boggs and Reisman 2006). Dentro del ORF se han caracterizado secuencias correspondientes a dominios de transactivación y de unión con la proteína Mdm2 en la parte N terminal de la proteína (Candau *et al.* 1997; Momand, Wu, and Dasgupta 2000) y dominios de oligomerización y de unión al ADN en C terminal (McKinney *et al.* 2004;

Wolkowicz and Rotter 1997), compartiendo una alta conservación dentro del grupo de vertebrados (Ou *et al.* 2007).

El gen Tp53 ha sido principalmente reportado en los humanos debido a la importancia clínica. Este gen posee un tamaño aproximado de 20 Kb y una organización de 11 exones y 10 intrones (Soussi and May 1996), los cuales expresan al menos 12 isoformas de transcritos producidos por eventos de “splicing” alternativo (Surget, Khoury and Bourdon 2013). Así mismo, se ha reportado la importancia que tienen las secuencias intrónicas en relación a la eficiencia de la actividad de p53 ya que pueden generar cadenas de ARN mutantes debido a eventos de “splicing” alternativos que conducen a una proteína deficiente o anómala (Baralle and Baralle 2005).

A nivel funcional esta proteína puede actuar como un factor de transcripción que regula la expresión de otros genes (Beckerman and Prives 2010) o interactuar directamente con otras proteínas (Loayza-Puch *et al.* 2013; Kruse and Gu 2009; Fridman and Lowe 2003; Keller, Zeng, and Lu 2003) para inducir a la apoptosis como mecanismo de protección (Rutkowski, Hofmann, and Gartner 2010). Dentro de los procesos que involucran a p53 se encuentra la respuesta al estrés en muchos organismos, mediante cambios en la interacción con algunos inhibidores como MDM2 que puede dar inicio a los procesos de apoptosis mediante la activación de proteínas como GPx y MnSOD (Hussain *et al.* 2004; Perry 2010), y participar en la detención del ciclo celular (Warmerdam and Kanaar 2010). En el caso del estrés por la variación de la temperatura, se genera una acumulación nuclear de la proteína p53 en algunas células, conduciendo a la sobreexpresión de la proteína p21 para detener el ciclo celular (Nitta *et al.* 1997; Chen, Lin-Shiau, and Lin 1999).

Otro de los procesos en los cuales está involucrado el gen p53 es el control del ciclo celular y el proceso de apoptosis en diferentes especies (Shaw 1996; Ammundson *et al.* 1998; Prykhozhiy 2010; Hou and Yang 2013; Fan *et al.* 2010). Dentro de la secuencia de ADN del gen p53 existen sitios codificantes de dominios de la proteína relacionados al reconocimiento y unión al ADN y a la

oligomerización. Estas regiones del gen de p53 son muy sensibles a mutaciones de pérdida de sentido y por ende altamente conservadas (Petitjean *et al.* 2007; Unger *et al.* 1993; Olivier *et al.* 2003).

Por otro lado, el avance de la biotecnología y los resultados alcanzados han conducido a la implementación de metodologías de transfección *in vitro* e *in vivo* en diferentes organismos. De esta manera se han desarrollado las tecnologías de ingreso de ARNs de doble cadena, vacunas de última generación, terapias génicas, obtención de organismos genéticamente modificados, entre otras más. Sin embargo, para establecer una metodología de transfección se debe tener en cuenta algunos criterios tales como la elección del tipo de vector, ya sea viral o no viral, de los cuales el último es preferido por su bajo potencial inmunogénico (Medina-Kauwe, Xie, and Hamm-Alvarez 2005). Este sistema hace uso de ADN plasmídico capaz de replicarse autónomamente y mantenerse dentro de la célula hospedera por un período de tiempo corto o muy extenso (Ebersbach and Gerdes 2005).

Existen diferentes formas de introducir un plásmido, por ejemplo, la microinyección, en la que se introduce el material genético directamente en el núcleo o en el citoplasma; la biolística en la que el ADN es disparado permitiendo su ingreso al núcleo celular; la electroporación, en la cual mediante pulsos eléctricos se generan poros en la membrana celular y permite el ingreso del material genético (Mehier-Humbert and Guy 2005; Khattak *et al.* 2012). Actualmente, además de estas técnicas, se utilizan los dendrímeros, moléculas arborescentes cargadas positivamente que se unen al ADN y son tomados por la célula, y la introducción de ADN-ligando mediada por receptores celulares (Kaestner, Scholz, and Lipp 2015).

Una alternativa es la utilización de agentes químicos que tengan la capacidad de unirse al ADN e ingresar a la célula, entre ellos se encuentran los liposomas y los policationes. Los liposomas son moléculas de naturaleza lipídica que encierran al ADN y cuando entran en contacto con las células ocurre un proceso de endocitosis liberando el ADN hacia el espacio intracelular (Cui *et al.*

2014). Dentro de las policonjugadas, el PEI (Polyetilenimine) es uno de los polímeros más utilizados para la realización de la transfección, ya que se reportó su capacidad de adherencia a la superficie de la membrana celular y el ingreso dentro de vesículas endocíticas, las cuales aumentan en tamaño y número hasta que se lisan y liberan el ADN que viaja luego hacia el núcleo (Godbey *et al.* 1999). Este compuesto es eficiente en un amplio número de organismos y es de baja toxicidad (Boussif *et al.* 1995; Hanzlíková *et al.* 2011).

Otra tecnología se ha desarrollado recientemente en el área de la ingeniería genética es el sistema de mutagenesis dirigida mediante la utilización de enzimas modificadas. Dentro de las variantes se han reportado las nucleasas unidas a dedos de zinc (ZFNs), las nucleasas efectoras tipo activadores de transcripción (TALENs) (Miller *et al.* 2011; Bogdanove and Voytas 2011) y los sistemas CRISPR/Cas9. Los TALENs constan de un dominio de reconocimiento de ADN formado por monómeros en serie, donde cada uno reconoce un nucleótido y un dominio de actividad nucleasa que ha perdido su especificidad (Cermak *et al.* 2011). Esta enzima actúa en forma de dímero para realizar un corte de doble cadena en la región blanco, lo que permite la ocurrencia de una mutación debido a la imperfección de los sistemas de reparación celular (Pfeiffer 1998; Heidenreich *et al.* 2003) y la posibilidad de quitar o insertar secuencias (Joung and Sander 2013).

2.3. Definición de términos básicos.

Apoptosis: Un tipo de muerte celular (programada) en el cual la célula responde a ciertas señales al iniciar una reacción normal que lleva a la muerte de ella misma. La muerte por apoptosis se caracteriza por la compactación de la célula y su núcleo, la disección ordenada de la cromatina en piezas debido a la acción de una endonucleasa específica que actúa sobre el ADN y luego una rápida fagocitosis de las células (Karp 2011).

ARNi: Es un proceso en el cual el ARN de doble cadena silencia específicamente la expresión de genes homólogos a través de la degradación de su ARNm cognato (Hutvagner and Simard 2008).

Curva de fusión: Todo fragmento de ADN de doble cadena tiene un punto de fusión (T_m) en el cual el 50% del ADN está en forma de simple cadena a una temperatura dada. Esta temperatura depende de la longitud del ADN, orden de la secuencia, contenido de GC y el tipo de apareamiento. La curva de fusión se forma debido a un incremento de la temperatura del ADN de doble cadena lo cual decrece la unión del ADN y por lo tanto la fluorescencia emitida por SYBR Green. La T_m es igual al punto de inflexión de la curva o el punto máximo de la curva derivada (Dorak 2007).

Exones: Parte de un gen procesado que contribuye al producto de un ARN maduro (Karp 2011).

Intrón: Parte de un gen que sufrió splicing y que corresponden a las secuencias interpuestas (Karp 2011).

Mutación: Un cambio espontáneo en un gen que altera a éste en forma permanente de tal manera que induce un cambio hereditario (Karp 2011).

Mutagenesis dirigida: Técnica que modifica un gen por medio de una vía predeterminada para producir una proteína con aminoácidos alterados (Karp 2011).

PCR: Es una técnica en la cual una sola región del ADN, que puede estar presente en diferentes cantidades, puede amplificarse con precisión y rapidez (Karp 2011).

PCR en tiempo real: Se define como la colección de la señal de fluorescencia de la reacción en cadena de la polimerasa a través de los ciclos (Dorak 2007).

Polimorfismo: Puede estar referido a los sitios del genoma que varían con gran frecuencia entre diferentes individuos en las poblaciones de una especie. Otra acepción refiere a los polimorfismos de un solo nucleótido que son sitios del genoma donde las bases alternas se encuentran con gran frecuencia en la población. Los polimorfismos de un solo nucleótido son excelentes marcadores genéticos para los estudios de mapeo de genoma (Karp 2011).

Promotor: El sitio del ADN en el que una molécula de polimerasa de ARN se une antes de iniciar la transcripción. El promotor contiene información que determina cuál de las dos cadenas de ADN se transcribe y el sitio en el cual comienza la transcripción (Karp 2011).

Splicing: Es el proceso de remoción de las secuencias de ADN interpuestas (intrones) de un transcrito primario (Karp 2011).

TALENs: Son secuencias de proteínas de unión al ADN conocidas como efectores tipo activadores de transcripción (TALEs por sus siglas en inglés) que han sido unidos a una nucleasa (FokI), y por consecuencia denominadas TALENs. Estas son diseñadas para ser módulos de edición de genes que parecen más fáciles de usar que los ZFNs. Las nucleasas cortan una secuencia de ADN deseada en el genoma creando una ruptura de doble cadena. El ADN es luego reparado usando la habilidad natural de las células, aprovechando para la generación de mutaciones (Hoy 2013).

Transcriptasa inversa: Una polimerasa de ADN dependiente de ARN. Es una enzima que utiliza el ARN como molde para sintetizar una cadena complementaria de ADN. Se encuentra en los virus que contienen ARN y se usa en el laboratorio para sintetizar ADNc (Karp 2011).

Transformación: Es la captación de ADN desnudo en una célula que lleva al cambio hereditario del genoma celular (Karp 2011).

Transfección: Es un término utilizado para referirse a la inserción de segmentos de ADN dentro de las células. Por ejemplo, la inserción de un gen que codifica a la proteína verde fluorescente de tal manera que la célula adquiere una fluorescencia bajo ciertas condiciones de iluminación. También es referido a la introducción de ARN de doble cadena en las células para causar silenciamiento por ARN de interferencia (Nill 2005).

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. Localidad y período de ejecución.

El presente trabajo se realizó en el departamento Tumbes, desde setiembre del 2014 a febrero del 2016.

3.2. Población, muestreo y muestra.

La población consistió en langostinos *Litopenaeus vannamei* juveniles de la langostinera La Fragata, Tumbes. La muestra consistió en 300 langostinos juveniles *L. vannamei* de la langostinera La Fragata colectados en el año 2015 y distribuidos en los diferentes ensayos.

3.3. Animales y condiciones de aclimatación

Los langostinos *L. vannamei* juveniles fueron donados por la langostinera La Fragata, ubicada en Puerto Pizarro, Tumbes. Los animales entre 3 y 7 gr fueron transportados en tanques con agua de mar hacia el centro experimental CEBAP donde se realizaron las pruebas. Los animales fueron aclimatados por dos semanas en tanques con 800 L de agua de mar, manteniéndolos a una temperatura de 28 ± 0.5 °C y una salinidad entre 28 a 32 ppt bajo un fotoperiodo natural y con aireación constante. Los langostinos fueron alimentados 2 veces al día con alimento balanceado Nicovita.

3.4. Colección de la muestra

Se extrajeron muestras de músculo abdominal de langostinos de 0.1 gr aproximadamente y se conservaron en etanol absoluto a -20°C hasta el momento de su procesamiento.

También se colectaron muestras de hemolinfa del seno ventral ubicado en la base del primer segmento abdominal de los langostinos. Primero se desinfectó el área de punción con alcohol 70% helado, luego se introdujo la aguja de una jeringa de 1 mL con 0.1 mL de Solución de Alsever modificada helada (Citrato de sodio 27 mM, NaCl 336 mM, Glucosa 115 mM, EDTA 9 mM, pH 7.0), la cual funcionó como anticoagulante (George and Dhar 2010). Se extrajo aproximadamente 0.1 mL y las jeringas fueron transportadas al laboratorio manteniéndolas frías antes de su procesamiento.

En el caso de los análisis moleculares, la hemolinfa fue colocada en un microtubo de 1.5 mL, y centrifugada a 13000 rpm, por 10 minutos a 4°C y se descartó el plasma, manteniendo solo los hemocitos. Para las pruebas por microscopía convencional, la hemolinfa fue colocada en microtubos de 1.5 mL, centrifugada a 2000 rpm por 8 minutos, se descartó el sobrenadante y los hemocitos restantes fueron resuspendidos en una solución salina (NaCl 450mM, 10mM KCl, EDTA.NA₂ 10 mM, HEPES 10mM regulado a pH 7.2) para los análisis al microscopio.

3.5. Obtención y construcción de los vectores de expresión

Los vectores de expresión utilizados fueron el plásmido pCMV-GFP (Addgene), el cuál fue proporcionado por Inca'Biotec SAC, y conservado a -20°C. Este plásmido circular de 4472 pb con capacidad para generar un alto número de copias posee un promotor del gen IE del citomegalovirus que controla la expresión del gen reportero incrementado EGFP. Además, posee un gen de resistencia a la ampicilina. Este vector fue utilizado para el establecimiento de metodologías de transfección en langostinos, debido a la presencia del gen reportero que facilitaría la detección de expresión.

Los vectores pTALENs fueron sintetizados de acuerdo al diseño informático basado en las secuencias de la región p53 de *L. vannamei*. Estos vectores de expresión poseen un promotor del gen IE del citomegalovirus, seguido de un promotor T7 para la transcripción *in vitro*. El fragmento TALEN

regulado por estos promotores consta de una secuencia codificante de una región N terminal con una señal de localización nuclear, la región de reconocimiento de ADN, la parte C terminal y la secuencia para la proteína fusión FokI. Además, posee una secuencia de resistencia a la ampicilina y a higromicina. La obtención de una proteína TALEN funcional requiere de dos vectores ya que es una proteína que funciona como dímero para realizar un corte de doble cadena y posteriormente obtener una mutación en el sitio blanco.

3.6. Diseño y construcción de los TALENs

Los sitios potenciales para el diseño de los TALENs fueron escaneados dentro de las regiones conservadas del gen p53 utilizando el programa TALEN Targeter ([https:// tale-nt.cac.cornell.edu/node/add/talen](https://tale-nt.cac.cornell.edu/node/add/talen)) (Doyle *et al.* 2012). La búsqueda se ajustó a la regla general del reconocimiento por TALEN (NG, HD, NI, y NN reconocen a T, C, A, y G respectivamente), un espaciador de 14-20 pb, entre 15 y 18 módulos repetidos y una base T en posición 0.

Para la construcción de los plásmidos codificantes de TALENs se utilizaron dos estrategias. La primera consistió en la obtención de los plásmidos portadores de TALENs en el laboratorio utilizando el kit de ensamble EZ-TAL™ (System Bioscience), siguiendo las recomendaciones del proveedor, las cuales se basan en amplificaciones por PCRs y ligaciones con plásmidos para la obtención de los plásmidos codificantes de TALENs. La segunda estrategia utilizada consistió en enviar los diseños de TALENs dirigidos al gen p53 a GeneCopoeia (Moore, Chandrabhas, and Bleris 2014) para su síntesis. Los vectores pTALENs sintetizados incluyen las secuencias para una de las regiones codificantes de la subunidad de la proteína TALENs (derecha o izquierda), una región promotora del virus CMV y la secuencia codificante de la proteína FokI, además de los genes de resistencia para la selección.

3.7. Transformación y purificación de plásmidos

Los plásmidos pCMV-GFP y pTALENs fueron transformados en bacterias *E. coli* JM109 competentes y luego purificados a partir de estas. Para la obtención de bacterias competentes, se reactivó un inóculo de bacteria en caldo LB, luego se dejó crecer a 37°C hasta la obtención de un OD entre 3.5 a 4.0, después se concentraron las bacterias a 4500 g manteniendo a 4°C por 10 minutos, el pellet fue resuspendido en CaCl₂ a 0.075 mM por 20 minutos a 4°C, luego se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 400 µL de CaCl₂ a 0.075 mM. Estas fueron conservadas a 4°C por máximo 4 días (Tu *et al.* 2005).

El método de transformación bacteriana utilizado en este trabajo se basó en la aplicación de un cambio brusco de temperatura (Sun *et al.* 2009; Singh *et al.* 2010). Se agregó 100 ng de cada uno de los plásmidos y a 50 µL de bacteria competente, luego se colocaron los microtubos con esta solución en hielo por 20 minutos. Después se sometió a una variación brusca de la temperatura llevando hasta 42°C, manteniéndolo por 90 segundos y regresándolo al hielo inmediatamente. Posteriormente se agregó 400 µL de caldo SOC (2% de triptona, 0,5% de extracto de levadura, NaCl a 10mM, KCl a 2.5mM, MgCl₂ a 10mM, MgSO₄ a 10mM, Glucosa a 20mM, todo diluido en agua destilada) y se incubaron las bacterias a 37°C por 2 horas aproximadamente. Finalmente se sembraron 100 µL del caldo con bacterias en placas de agar LB con 100 µg/mL de ampicilina y fueron llevadas a 37°C y evaluadas luego de 18 horas.

Las colonias positivas fueron sembradas en caldo LB e incubadas por 24 horas a 37°C. Luego se utilizó el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Science Scientific) siguiendo el protocolo sugerido por el proveedor, los plásmidos fueron resuspendidos en la solución tampón del kit. Además, los plásmidos fueron purificados con el kit GeneJET Plasmid Maxiprep partiendo de 100 mL de caldo con *E. coli* a 1 OD aproximadamente y siguiendo las recomendaciones del proveedor. Posteriormente, los plásmidos fueron

cuantificados y migrados por electroforesis en un gel de agarosa al 1.0 % con 80V por 60 minutos. El gel fue expuesto a luz UV para la observación de las bandas.

3.8. Extracción del ADN genómico

Se procesaron 2 tipos de tejidos el muscular y hemocitos, luego se siguió el protocolo de Aljanabi y Martinez (Aljanabi and Martinez, 1997) con algunas modificaciones para la extracción de ADN. Se agregó 400 μ L para músculo y 200 μ L para hemocitos de una solución de lisis TEN (0.4 M de NaCl, 10 mM de Tris-HCl pH 8 y 50 mM de EDTA) y SDS al 20%, después de una incubación a 60°C se agregó NaCl a 6 M por una hora y se centrifugó a 13000 rpm, el ADN incluido en el sobrenadante fue precipitado utilizando 2 volúmenes de etanol absoluto, luego se lavaron las muestras en etanol 70% y se resuspendieron en 30 μ L de solución TE (Tris 10 mM pH 8.0, EDTA 1mM). El ADN extraído fue conservado a -20°C.

3.9. Extracción del ARN total

La extracción del ARN total fue realizada de las muestras colectadas de músculo y hemocitos utilizando la metodología de TriReagent (Molecular Research Center, Inc) homogenizando el tejido con el TriReagent, luego se purificó con cloroformo a 13000 rpm a 4°C por 15 minutos y el sobrenadante que contenía el ARN se precipitó con isopropanol y se lavó con etanol al 70%, después se resuspendió en agua libre de nucleasas y finalmente se aplicó un tratamiento con ADNasa I (Roche) incubando las muestras a 37°C por 20 minutos. Se inactivó la enzima a 75°C por 10 minutos.

3.10. Síntesis de ADNc

El ADNc fue sintetizado a partir del ARN total extraído de músculo y de hemocitos empleando el kit RevertAid (Thermo Scientific) y siguiendo las indicaciones del proveedor. El oligodT₂₀ 100 μ M (IDT DNA) fue utilizado como

iniciador de la reacción de la transcripción reversa. Se tomó 8 μL de ARN y se mezcló con 100 pmol de oligodT a 65°C, luego se colocaron en hielo y se agregó la mezcla de la enzima Revert Aid con su solución tampón, los dNTPs y un inhibidor de las ARNasas (Ribolock 40U/ μL), estos fueron incubados a 42°C por 60 minutos y luego a 70°C por 10 minutos para inactivar la enzima. El ADNc obtenido fue conservado a -20°C.

3.11. Diseño de iniciadores

Los iniciadores fueron diseñados en base a la secuencia del gen Lvp53 (KC422442) para la caracterización de sus secuencias. Se identificaron las secuencias de nucleótidos codificantes de los motivos de unión al ADN y de oligomerización de la proteína p53 y se diseñaron iniciadores cercanos a estas regiones, con el objetivo de definir las regiones intrónicas y exónicas. Los iniciadores fueron diseñados mediante el programa PrimerBlast, luego se analizaron sus propiedades termodinámicas con la herramienta Oligoanalyzer (IDT DNA) y se seleccionaron aquellos con bajas probabilidades de formar estructuras secundarias. Estos fueron cotejados con el programa BLASTn para determinar su especificidad. Finalmente, los iniciadores elegidos fueron enviados a IDT DNA para su síntesis.

3.12. Amplificación por PCR

La amplificación de regiones del gen p53 de *L. vannamei* (Lvp53) fue realizada en búsqueda de caracterizar algunas regiones intrónicas del gen Lvp53. La amplificación fue desarrollada en un volumen de 25 μL conteniendo aproximadamente 100 ng de ADNg o de ADNc, 1 U de la Taq polimerasa recombinante (Thermo Scientific), 0.2 mM de cada dNTP, 0.6 μM de cada iniciador, 1.5 mM de MgCl_2 y la solución tampón de la polimerasa a 1X. El programa utilizado en el termociclador fue 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, una temperatura de hibridación variable entre 56 a 60°C por 30 segundos para la caracterización de regiones del gen Lvp53 y a 58°C para amplificar la región blanco de mutación, y a 72°C por 1 minuto.

Después de un ciclo de extensión final de 72°C por 6 minutos y se mantuvieron los productos a 4°C. Los productos de PCR obtenidos fueron separados por una migración electroforética utilizando un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio a 0.5 µg/mL sumergido en una solución tampón TAE 1X. Se utilizaron 90V por 40 minutos para la migración.

3.13. Secuenciación de amplicones

Los productos de PCR obtenidos de la prueba de caracterización de regiones del gen Lvp53 fueron enviados a secuenciar en ambas direcciones a Macrogen (USA) por electroforesis capilar con un analizador ABI 3730xl (Applied Biosystems), y se obtuvieron las secuencias sobre ambas cadenas utilizando los iniciadores sentido y antisentido utilizados anteriormente correspondientes a cada fragmento.

3.14. Ensayo de estrés térmico

El primer grupo de ensayos experimentales consiste en la evaluación del efecto del estrés térmico sobre los niveles de expresión del gen Lvp53 de hemocitos del langostino. Para su realización, los animales de 4 a 6 gr fueron colocados en una cantidad de 8 animales por tina con 20 L de agua de mar aproximadamente y mantenidos a las condiciones de aclimatación. Los ensayos de estrés térmico consistieron en 2 pruebas.

La primera de ellas consistió en modificar la temperatura del agua en cada tina desde 28°C hasta 33°C, 35°C y 25°C, utilizando termostatos y agua de mar atemperada. La tasa de variación de temperatura fue de 5°C por hora aproximadamente y se destinó una tina para cada temperatura, cada una de ellas con 8 animales. Además, una tina se mantuvo a 28°C como control. Las muestras requeridas para el análisis fueron los hemocitos y la colecta se realizó una hora después de alcanzar la temperatura deseada.

En el segundo ensayo, se colocaron tinas con 20 L de agua de mar, una de ellas a 21°C y la otra a 37°C, luego se colocaron 8 langostinos, mantenidos inicialmente a 28°C en cada una de ellas. Los animales fueron expuestos por 15 minutos antes de coleccionar la muestra de hemocitos.

3.15. Análisis de la expresión del gen Lvp53

Las evaluaciones de la expresión del gen Lvp53 en situaciones de estrés térmico fueron realizadas mediante una amplificación por PCR en tiempo real a partir del ADNc. Se utilizó el kit de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (ThermoScientific) siguiendo las recomendaciones del proveedor se adicionó 12.5 µL del buffer junto con la polimerasa, luego se adicionó 9.5 µL de agua libre de nucleasas el agua, 1 µL de cada iniciador qp53F1: TTCAAGCAAAGCTGCCACC y de qp53R1: ATTCACAGCCCTCACCCCTC para amplificar un fragmento de p53, además, se utilizaron los iniciadores qEfaF1 y qEfaR1(Incabiotec SAC) para amplificar un fragmento del gen Efa1 alpha de langostino de 150 pb, aproximadamente, el cual sirvió como gen de referencia para los análisis (Dhar *et al.* 2009; Chen *et al.* 2015). Finalmente, se agregó 1 µL de ADNc completando la reacción a 25 µL. Las reacciones fueron llevadas al termociclador StepOne (Applied Biosystem) y expuestas a 95°C por 10 minutos, luego 40 ciclos de 95°C por 15 seg, 59°C por 30 seg. y 72°C por 30 seg. y la lectura de la fluorescencia fue realizada en el paso de extensión. Para obtener la curva de fusión, las reacciones fueron expuestas a 95°C por 15 seg., luego a 55°C por 1 minuto y se incrementó la temperatura a 0.3°C cada 20 segundos hasta alcanzar 95°C. La cuantificación relativa del gen p53 fue calculada utilizando el método comparativo por $\Delta\Delta C_t$ (Schmittgen and Livak 2008).

3.16. Ensayo de transfección de pCMV-GFP en langostinos

Se realizaron pruebas para establecer una metodología de transfección *in vivo* de los hemocitos. El primer ensayo consistió en evaluar el efecto de la concentración del plásmido pCMV-GFP sobre la expresión del gen reportero

GFP en los hemocitos. En este ensayo se agruparon en 10 langostinos de 4 – 6 gr por tina con 30 L de agua de mar. Las cantidades de plásmidos evaluadas fueron 5 µg, 10 µg y 15 µg, las cuales fueron mezcladas con la solución transfectante a un volumen de 100 µL. La solución resultante fue cargada en una jeringa de 1mL y se inyectó en el seno ventral de cada langostino. Después de 24 horas las muestras de hemolinfa fueron colectadas, procesadas y analizadas mediante pruebas moleculares y observación de la fluorescencia de la proteína verde fluorescente (GFP).

El segundo ensayo fue realizado para determinar la relación entre el tiempo de colecta de la muestra posterior a la transfección y la expresión del gen reportero. Se distribuyeron 5 animales por tina para este ensayo y se utilizó una cantidad única de 10 µg del plásmido pCMV-GFP, junto con el PEI para las transfecciones. Los tiempos de colecta fueron 12, 24 y 48 horas y se analizó la expresión a través de pruebas moleculares y por microscopía confocal.

3.17. Preparación del plásmido/transfectante

Los plásmidos pCMV-GFP purificados fueron utilizados para los ensayos de establecimiento de la transfección. Antes de la transfección de los plásmidos, éstos fueron mezclados con la solución transfectante PEI 25000 KDa (Sigma Aldrich). Los plásmidos fueron adicionados a un microtubo en las cantidades acorde a cada ensayo, luego se añadió NaCl 150 mM hasta alcanzar 50 µL y se homogenizó suavemente. En otro tubo se agregó 2 µL de PEI por cada µg de plásmido (ratio N/P=3) y se completó con NaCl 150 mM hasta 50 µL, luego se homogenizó completamente. Finalmente, se agitó con un vortex por 15 segundos, se traspasó el volumen de solución con PEI al microtubo con la solución de ADN y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente antes de ser utilizado.

Los plásmidos TALENs fueron mezclados con la solución transfectante jetPEI *in vivo* (Polypus) como agente transfectante siguiendo las

recomendaciones del proveedor. Cada plásmido fue mezclado en una cantidad de plásmido total de 10 µg con una solución de glucosa al 5% en un volumen de 50 µL, en otro microtubo se mezclaron 1.2 µL de jetPEI en 50 µL de solución de glucosa al 5%. Ambas mezclas se homogenizaron y después se agregó la solución de jetPEI hacia el microtubo con la solución plasmídica, se homogenizó por vortex y se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente antes de ser utilizados.

3.18. Análisis de la expresión del gen reportero EGFP

Las evaluaciones de la expresión del gen EGFP de los animales transfectados fueron realizadas mediante una amplificación por PCR en tiempo real a partir del ADNc. Se utilizó el kit de Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (ThermoScientific) siguiendo las recomendaciones del proveedor. Se usaron los iniciadores exitosos en la amplificación del fragmento EGFP. Se utilizaron los iniciadores qEfaF1 y qEfaR1 correspondientes al gen Efa1 alpha de langostino, el cual sirvió como gen de referencia para los análisis. Finalmente se agregó 1 µL de ADNc completando la reacción a 25 µL. Las amplificaciones fueron realizadas según la siguiente programación: 95°C por 10 minutos, luego 40 ciclos de 95°C por 15 seg., 59°C por 30 seg. y 72°C por 30 seg., en este último se realizó la lectura de la fluorescencia. Para obtener la curva de fusión, las reacciones fueron realizadas a 95°C por 15 seg., luego a 55°C por 1 minuto y se incrementó la temperatura a 0.3°C cada 20 segundos hasta alcanzar 95°C. La cuantificación relativa del gen EGFP fue calculada utilizando el método comparativo por $\Delta\Delta C_t$ (Schmittgen and Livak 2008).

3.19. Detección por microscopía confocal

Los hemocitos colectados de los langostinos pertenecientes a las evaluaciones de transfección de pCVM-GFP fueron evaluados mediante la detección de la fluorescencia utilizando el microscopio confocal FV10i-LIV (Olympus). Las muestras de hemolinfa fueron centrifugadas a 2000 rpm por 8

minutos, luego se descartó el sobrenadante y los hemocitos restantes fueron resuspendidos en la solución salina (NaCl 450mM, 10mM KCl, EDTA.NA₂ 10 mM, HEPES 10mM regulado a pH 7.2) (Vargas-Albores, Guzmán, and Ochoa 1993). Luego se colocaron los hemocitos sobre una lámina para ser observados al microscopio. El láser de emisión del equipo fue ajustado a 488 nm con una intensidad de 40.5% y el filtro de excitación a 510 nm correspondiente a los parámetros de EGFP. La intensidad del láser fue ajustada para evitar la detección de artefactos de fluorescencia nativa del langostino.

3.20. Ensayo de mutagénesis dirigida al gen Lvp53

Un tercer grupo de ensayos experimentales consistió en la obtención de mutaciones dirigidas al gen Lvp53 en hemocitos de langostino. Las pruebas experimentales se realizaron en recipientes con 30 L de agua de mar, siguiendo las condiciones utilizadas en la aclimatación y distribuyendo 5 animales por tina. Se utilizaron 3 tinas, en la primera los animales fueron transfectados con los plásmidos codificantes de pTALEN 1 más jetPEI, en la segunda aquellos codificantes de pTALEN 2 más el jetPEI y en la tercera solo jetPEI. La transfección de hemocitos fue realizada vía inyección del complejo Tal-jetPEI en la cavidad abdominal de los langostinos juveniles. Se cargaron 100 µL de solución transfectante con plásmido en una jeringa de 1 mL y se inyectó en el seno ventral de los langostinos. La colecta de muestras se realizó a las 48 horas post inyección para los análisis de la expresión de la enzima FokI y 96 horas posterior a la transfección para el análisis del ADNg y la morfología de hemocitos.

3.21. Evaluación citológica

Los hemocitos provenientes de la transfección con los plásmidos codificantes de TALENs fueron colectados y resuspendidos en la solución salina estéril. A partir de esta solución se cogió una gota y se colocó sobre una lámina. Los hemocitos fueron fijados con metanol por 7 minutos, luego se

tiñeron con el colorante Giemsa al 10% por 20 minutos, se enjuagaron con agua destilada y se observaron en un microscopio (Olympus). Se realizaron observaciones de los hemocitos teñidos para detectar algún cambio en la morfología de las células y del núcleo que puedan estar relacionados con la mutación de Lvp53 la cual conduzca a procesos de inmortalización (Matozzo and Marin 2010).

3.22. Procesamiento y análisis de datos

Análisis de secuencia

Las secuencias de ADN sentido y antisentido obtenidas para cada fragmento del gen Lvp53 fueron ensambladas con el programa libre Sequencher 5.2.4 (Gene Codes Corporation), luego las secuencias consenso resultantes fueron analizadas utilizando el programa Blastn (GenBank), ajustando los parámetros para una búsqueda con poca similitud, para determinar su correspondencia con el gen Lvp53. Estas secuencias fueron alineadas en el programa ClustalX. Las regiones intrónicas probables fueron confirmadas utilizando el programa libre NNSPLICE 0.9 (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) en el cual se ingresaron las secuencias consenso en formato FASTA, se ajustó la búsqueda a la base de datos de humanos u otras especies, con valores de score por defecto a 0.4 y se buscaron los sitios aceptores 3' y donadores 5' (Reese *et al.* 1997).

Análisis del polimorfismo

Los polimorfismos de secuencia de las regiones intrónicas estudiadas fueron obtenidos del alineamiento y comparación de secuencias realizado con el programa Mega 5.2, aprovechando la herramienta de análisis de datos donde se encontraron los sitios conservados y los sitios variables dentro de las regiones intrónicas. Los polimorfismos analizados fueron de tipo sustitución nucleotídica y de tipo Indel. (Tamura *et al.* 2011).

Identificación de motivos reguladores

Las secuencias de ADN_g obtenidas a partir de las amplificaciones fueron analizadas con el programa libre RegRNA (<http://regrna.mbc.nctu.edu.tw/html/prediction.html>) (Huang *et al.* 2006), considerando a las secuencias como pre-mRNA y se han analizado la presencia de motivos de tipo reguladores de splicing encontrados en exones y en intrones, y motivos reguladores transcripcionales. Por otro lado, se utilizó la herramienta informática FAS-ESS (<http://genes.mit.edu/fas-ess/>) para determinar las posibles secuencias silenciadores de splicing (Wang *et al.* 2006).

Datos de la expresión génica

En el caso de los datos obtenidos a partir de una amplificación por PCR en tiempo real, estos fueron procesados con el programa StepOne v2.2.2 para obtener los valores del Ct, las T_m y para realizar los cálculos de la expresión relativa de los genes Lvp53 y EGFP y la obtención de los gráficos se utilizaron este programa en conjunto con el Microsoft Excel. Las imágenes obtenidas por el microscopio de fluorescencia fueron procesadas con el programa FV10i correspondiente al equipo de microscopía por fluorescencia.

Análisis estadístico

Para el análisis de las expresiones de Lvp53 y de EGFP en los ensayos de estrés térmico se utilizó la prueba t-student no apareada con un $p < 0.05$. Los análisis fueron realizados utilizando la herramienta t test calculator del programa libre (<http://graphpad.com/quickcalcs/ttest1.cfm>). Los promedios y varianzas fueron calculadas utilizando el programa Microsoft Excel.

4. RESULTADOS.

4.1 Caracterización parcial del gen *Lvp53*

El ADNg total y ADNc extraídos del músculo de *L. vannamei* fueron utilizados como plantilla para la amplificación en combinación con los iniciadores diseñados para la obtención de posibles secuencias intrónicas, los cuales son mostrados en la tabla 1. Sin embargo, sólo 2 juegos condujeron a la obtención de un amplicón, p53F2-p53R2 y p53F3-p53R3. Los fragmentos obtenidos fueron migrados por electroforesis junto a un marcador de peso molecular tipo escalera de 100 pb (Thermo Scientific), (Figura 1). Los productos obtenidos tuvieron un peso aproximado a 500 pb correspondiendo al ADNg y los amplicones correspondientes al ADNc fueron cercanos a 200 pb. Estos resultados muestran una variación entre la longitud encontrada experimentalmente de los productos de ADNg con los tamaños (Tabla 1) de la secuencia de ADNc del gen *Lvp53* (KC422442) ya reportados, indicando la posible presencia de intrones dentro de los fragmentos obtenidos.

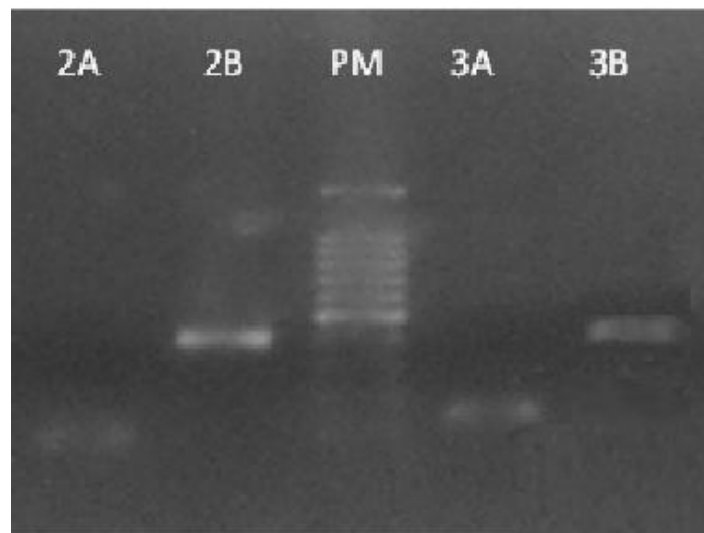


Figura 1: Amplificación por PCR de ADNg y de ADNc. Los amplicones fueron migrados en un gel de agarosa al 1.5% junto con un marcador de peso molecular de 100 pb y fue revelado con bromuro de etidio. 2A y 2B: Los productos correspondientes al juego de iniciadores p53F2-p53R2 para el ADNc y el ADNg, respectivamente. 3A y 3B: Los productos correspondientes al juego de iniciadores p53F3-p53R3 para el ADNc y el ADNg, respectivamente.

Tabla 1: Iniciadores utilizados para análisis por PCR y RT-PCR

Iniciador	Secuencia del iniciador (5'- 3')	Ubicación	Tamaño esperado del producto	T°h	Gen blanco
p53F1	AATCCCGTGGGATTCTCT	506-523	107 pb	58°C	Lvp53
p53R1	GCAGGAAGTGGTAGAGCC	629-612			
p53F2	TGCCTGGCTGACTCTACTCT	627-646	142 pb	56°C	Lvp53
p53R2	GTACGGCAACATTTGGGCAG	789-770			
p53F3	CTGCCCAAATGTTGCCGTAC	770-789	185 pb	60°C	Lvp53
p53R3	CACCCTCGACCTGCACTAAA	954-935			
p53F4	TTTAGTGCAGGTCGAGGGTG	935-954	147 pb	60°C	Lvp53
p53R4	CCTCCAACGCATGAAGTCAGA	1081-1061			
qp53F1	TTCAAGCAAAGCTGCCACC	846 - 864	120 pb	59°C	Lvp53
qp53R1	ATTCACAGCCCTCACCTC	966-948			
MutF	GCCTTTATGAATGGTGCTTG	No reportado	570 pb	58°C	Lvp53
MutR	CACATCATTTGCAAACACCT	No reportado			
qGFPF1	CCGACCACTACCAGCAGAAC	1217-1236	109 pb	58°C	EGFP
qGFPR1	CGCTTCTCGTTGGGGTCTTT	1325- 1306			
qGFPF2	AAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGC	802 - 825	201 pb	59°C	EGFP
qGFPR2	CTTGAGTTGCCGTCGTCCTTGAA	979 - 1002			

4.2 Análisis de secuencias de Lvp53

Los productos provenientes del ADN_g que incluían posibles regiones intrónicas fueron secuenciados en ambos sentidos, luego se obtuvieron las secuencias consenso resultantes (Seq 1 y Seq 2) las cuales fueron comparadas con la base de datos del GenBank mediante el programa Blastn, donde se encontró una alta homología con la secuencia del ADN_c de p53 de *L. vannamei* (GenBank: KC422442) en los fragmentos de los extremos 5' y 3' de ambas secuencias, y una secuencia sin homología que interrumpe en la parte central (Figura 2). Este resultado apoya la hipótesis de la presencia intrones en este gen. Además, se observó que ambas secuencias se traslapan en aproximadamente 22 pb del extremo 3' de la Seq. 1 y el extremo 5' de la Seq. 2, así que esto genera un fragmento mayor con 2 intrones consecutivos. En este estudio solo se ha realizado una caracterización parcial del gen Lvp53, debido a que se desconoce la presencia de otras secuencias intrónicas.



Figura 2: Secuencia de nucleótidos de 2 fragmentos del ADN_g del gen p53 de *Litopenaeus vannamei* (coloreadas de negro), comparadas con la secuencia publicada de ADN_c de Lvp53 (GenBank: KC422442) (coloreadas de rojo). Las regiones intrónicas son sombreadas en la secuencia de ADN_g y representadas por guiones en el ADN_c.

4.3 Caracterización de la región exónica e intrónica

Ambas secuencias, Seq. 1 y Seq. 2, poseen en su interior regiones exónicas e intrónicas. A partir de las secuencias obtenidas se pudo caracterizar parcialmente un exón de 109 pb en el extremo 5' de Seq. 1, el cual posee 54.1% de GC. En esta región se ubica un sitio codificante de un motivo de unión al ADN GCC (492-494) de la proteína Lvp53, el cual codifica

el aminoácido lisina. Luego se identificó un exón completo en el solapamiento de Seq. 1 y Seq. 2 con un tamaño de 174 pb y 47.7% de GC. En este exón se encontraron sitios codificantes de los motivos de oligomerización son TAC (120-122), AAC (123-125), TGC (126-128) y AGT (132-134), los cuales codifican tirosina, asparagina, cisteína y serina respectivamente (Quian *et al.* 2014). Finalmente, en el extremo 3' de la secuencia Seq. 2 se halló una región exónica de 45 pb y 48.9% de GC.

Las regiones intrónicas ubicadas dentro de las dos secuencias evaluadas se han denominado intrón A y B, respectivamente. El intrón A es el más proximal al extremo 5' de las secuencias obtenidas, éste posee una longitud de 306 pb y está ubicado en la posición 734 de la secuencia de Lvp53 (KC422442). Los sitios donadores GT en el extremo 5' del intrón y el aceptor AG ubicado en el extremo 3' (Burge *et al.*, 1999) fueron ubicados con el programa disponible de manera libre NNSPLICE 0.9, con el cual se obtuvieron 2 posibles sitios donadores y 3 posibles aceptores, sin embargo, teniendo en cuenta la alineación en Blastn, se aceptó como sitio donador 1, con GT en posición 110 pb (score = 0.86) y como aceptor la secuencia AG ubicada en la posición 414 pb (0.73), a pesar de que ambos tuvieron los valores de score más bajos (Tabla 2).

El intrón B posee una longitud de 227 pb y está ubicado en la posición 909 de la secuencia Lvp53 (KC422442). De igual forma que en el intrón A, se obtuvieron 2 posibles sitios donadores GT y 3 posibles sitios aceptores AG (Tabla 2), contrastando con los resultados de la alineación en Blastn se aceptó al donador 2 (score = 0.99) y al aceptor 3 (score = 0.98) (Tabla 2).

Tabla 2: Sitios críticos donantes y aceptores identificados en los intrones A y B

Intrón	Sitio	Inicio	Fin	Exón	Intrón	Score
Intrón A	Donador 1	103	117	caacaag	gtgtgctg	0.86
	Donador 2	173	187	tcactat	gtaagtgt	0.99
Intrón B	Donador 1	109	123	tgaacag	gtgtctaca	0.48
	Donador 2	135	149	attcaaa	gtaagtgt	0.99

Intrón	Sitio	Inicio	Fin	Intrón	Exón	Score
Intrón A	Aceptor 1	225	265	attattattttgttttaa ag	gaactttctgagaataaaga	0.92
	Aceptor 2	288	328	ttatttggttttatgcat ag	gaatttgatatttatagtt	0.91
	Aceptor 3	395	435	ctaacatgctttgtctgc ag	tggtgctacagtcaggatct	0.73
Intrón B	Aceptor 1	186	226	tttatctgttggtattacc ag	ggcaagtgtaaaggcattg	0.45
	Aceptor 2	275	315	ttcatgtctttttatttt ag	attgaaatagaaaggaataa	0.99
	Aceptor 3	339	379	attcttttccctctccct ag	actgtgatccaaatttgct	0.98

4.4 Análisis de polimorfismos

Para la identificación de polimorfismos, se analizaron las secuencias obtenidas del intrón A de 19 individuos y las secuencias obtenidas del intrón B de 16 de ellos. Se tomaron en cuenta solo las secuencias consenso y se alinearon entre ellas para determinar los sitios con mayor polimorfismo. Utilizando el programa Mega se consiguió resaltar los sitios polimórficos con letras y los sitios conservados con puntos (Figura 3). La secuencia portadora del intrón A muestra 16 sitios polimórficos en la región intrónica, por lo tanto, una homología de 94.7%, indicando así gran conservación de la secuencia entre diferentes individuos. Por otro lado, la región del intrón B posee una mayor cantidad de polimorfismos incluyendo sustituciones de bases como en el intrón A, pero además posee polimorfismos de tipo inserciones y deleciones esparcidos por toda la región intrónica, alcanzando solo un 68.3% de homología entre las secuencias. Se puede observar una región dentro del intrón B que muestra polimorfismo de tipo inserción/delección de aproximadamente 21 pb.

Intrón B

#Ind.1	GTAAGTGTGT	AAATGTTCTT	TTTTACACTT	TCCTTTCCTT	TTTT-CCATT	TATCTGTTGG	TATTACCARG	CCTGTATGTA	[80]
#Ind.2	[80]
#Ind.3	[80]
#Ind.4	[80]
#Ind.5	[80]
#Ind.6	[80]
#Ind.7	[80]
#Ind.8	[80]
#Ind.9	[80]
#Ind.10	[80]
#Ind.11	[80]
#Ind.12	[80]
#Ind.13	[80]
#Ind.14	[80]
#Ind.15	[80]
#Ind.16	[80]
#Ind.1	AAGGCATTGA	AAATATTTTA	GGTGTTCGCA	AATGAAT---	-ATTTCATGA	AATGACATGA	TTT-CATGTC	TTTTATTTT	[160]
#Ind.2	[160]
#Ind.3	[160]
#Ind.4	[160]
#Ind.5	[160]
#Ind.6	[160]
#Ind.7	[160]
#Ind.8	[160]
#Ind.9	[160]
#Ind.10	[160]
#Ind.11	[160]
#Ind.12	[160]
#Ind.13	[160]
#Ind.14	[160]
#Ind.15	[160]
#Ind.16	[160]
#Ind.1	TAGATTGAAA	TARAAAGGAA	TAATTTAAGA	TAAATTAAGT	AATTTTATTC	T-TT-CCCTC	TCCCCTA	[227]	
#Ind.2	[227]	
#Ind.3	[227]	
#Ind.4	[227]	
#Ind.5	[227]	
#Ind.6	[227]	
#Ind.7	[227]	
#Ind.8	[227]	
#Ind.9	[227]	
#Ind.10	[227]	
#Ind.11	[227]	
#Ind.12	[227]	
#Ind.13	[227]	
#Ind.14	[227]	
#Ind.15	[227]	
#Ind.16	[227]	

Figura 3: Análisis de los polimorfismos entre las secuencias de los intrones A y B. Se analizaron 19 secuencias del intrón A, encontrando un 94.6% de conservación a diferencia del intrón B, en el que se analizaron solo 16 secuencias pero se identificó una mayor variabilidad y en este grupo de secuencias se presentó solo un 68.3% de conservación.

4.5 Sitios reguladores

Después de identificar las regiones exónicas e intrónicas, se realizó una búsqueda de posibles motivos reguladores de la expresión y sitios blanco de miARNs utilizando el programa RegRNA enfocándose en las cadenas positivas y negativas. El análisis del intrón A resultó en la presencia de algunos sitios reguladores relacionados con 5 motivos reguladores de la expresión mediante el proceso de splicing alternativo y un posible sitio de regulación de la transcripción homólogos en humanos. En el caso del intrón B se encontraron 5 posibles motivos reguladores de splicing ubicados a lo largo del intrón y 2 secuencias potenciadores de la transcripción homólogas en

4.6 Respuesta del gen Lvp53 a un estrés por temperatura

Para analizar la respuesta del gen Lvp53 del langostino a condiciones de estrés por elevación gradual de la temperatura, se analizaron los niveles de expresión del gen Lvp53 de los animales expuestos por una hora a 25°C, 33°C y 35°C. Los transcritos de ARNm del gen Lvp53 fueron analizados por PCR en tiempo real a partir de los hemocitos extraídos de langostinos. Como muestras control o de referencia se usaron los langostinos aclimatados inicialmente a la temperatura de 28°C. Los resultados obtenidos muestran que la expresión relativa del gen Lvp53 se incrementó cuando los langostinos fueron expuestos a las temperaturas diferentes a 28°C (Figura 5). A 25°C se muestra un pequeño incremento (2.8 veces que la del control) en la expresión de Lvp53. Lo mismo ocurre a 35°C, en el cual el aumento es mayor que el presentado con la temperatura anterior (4.6 veces que la del control). Y finalmente cuando los langostinos fueron expuestos por una hora a 33°C mostraron la mayor expresión relativa (7.9 veces el control) (Tabla 4). Sin embargo, las diferencias entre los valores obtenidos para las temperaturas 25°C, 33°C y 35°C en comparación con 28°C no fueron significativas cuando fueron analizadas con la prueba T – student ($p>0.05$).

Tabla 4: Análisis comparativo $\Delta\Delta Ct$ de la expresión relativa de Lvp53 ante un estrés térmico

Temperatura de exposición	Gen blanco	ΔCt promedio	$\Delta\Delta Ct$	RQ	RQ max	RQ min
28°C	Lvp53	3.879	0.000	1.000	0.134	7.456
25°C	Lvp53	0.931	-1.476	2.783	0.980	78.813
33°C	Lvp53	-1.986	-4.393	7.977	0.008	7575.449
35°C	Lvp53	-0.411	-2.197	4.584	0.049	432.882

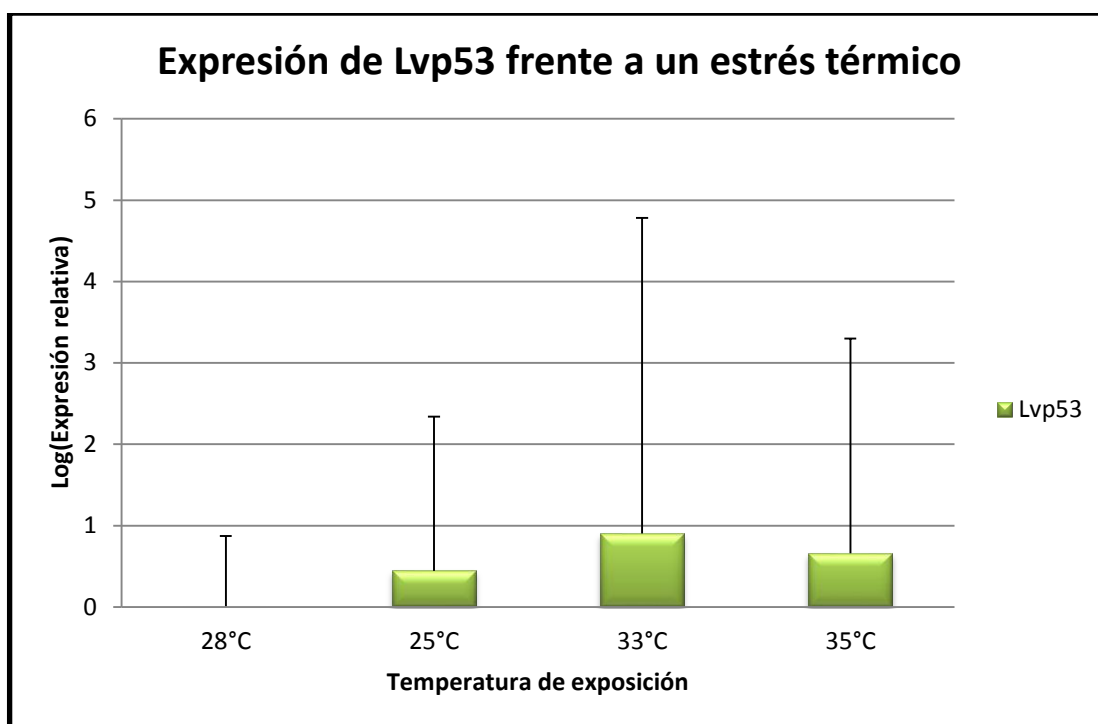


Figura 5: Niveles de expresión relativa de Lvp53 ante un estrés térmico de 28°C a 25°C, 33°C y 35°C mostrados como el logaritmo de la expresión. Se aprecia un ligero aumento poco significativo en la expresión obtenida a las temperaturas 25°C, 33°C y 35°C en comparación con el grupo de 28°C ($p > 0.05$).

4.7 Respuesta del gen p53 al choque térmico

Se analizó la expresión de gen Lvp53 utilizando la PCR en tiempo real utilizando los iniciadores qp53F1 y qp53R1 partir de hemocitos de langostinos sometidos a un cambio inmediato de temperatura del agua. Para este ensayo los langostinos mantenidos a 28°C fueron traspasados a 21°C y 37°C donde se mantuvieron por 15 minutos antes de la colecta de muestras. De igual manera que la prueba anterior, se obtuvo un incremento de la expresión de Lvp53 cuando se aumentó o disminuyó la temperatura súbitamente (Figura 6). La expresión relativa de Lvp53 obtenidas a 21°C fue mayor (1.51 veces) a la obtenida a 28°C y en el caso de la expresión a 37°C, ésta fue de 5.3 veces la obtenida a la temperatura base (Tabla 5). A pesar de esto, el análisis estadístico muestra que las diferencias fueron no significativas con un $p > 0.05$.

Tabla 5: Análisis comparativo $\Delta\Delta Ct$ de la expresión relativa de Lvp53 ante un shock térmico.

Temperatura de exposición	Gen blanco	ΔCt promedio	$\Delta\Delta Ct$	RQ	RQ max	RQ min
28°C	p53	-1.525	0.000	1.000	0.097	10.348
21°C	p53	-2.124	-0.599	1.514	0.724	115.485
37°C	p53	-3.934	-2.409	5.311	1.133	28.855

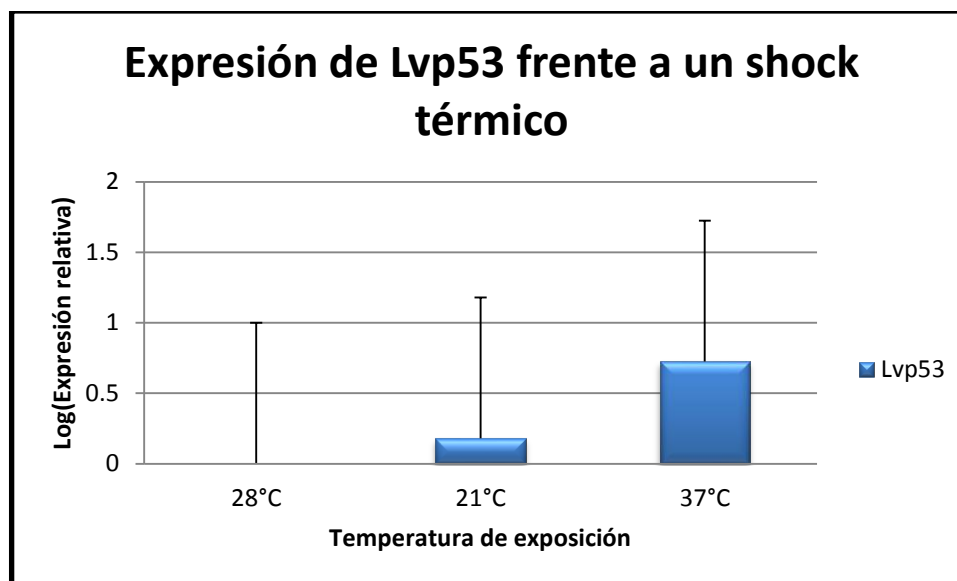


Figura 6: Niveles de expresión relativa de Lvp53 ante un choque térmico de 28°C a 37°C o a 21°C expuestos por 15 minutos. La diferencia entre los niveles de expresión de los tratamientos fue no significativa ($p > 0.05$), sin embargo, se aprecia una sobreexpresión considerable cuando es llevado a 37°C.

4.8 Implementación de metodología de transfección

A partir del plásmido conservado de pCMV-GFP y mediante las técnicas de transformación bacteriana en *Escherichia coli* JM109 se consiguió clonar este vector plasmídico para alcanzar las concentraciones requeridas para el experimento. Los plásmidos obtenidos fueron migrados por electroforesis (Figura 7) observándose la calidad de la purificación del plásmido con el kit GeneJet miniprep. Además, los plásmidos fueron cuantificados para realizar las transfecciones (Tabla 6). Debido a que las cantidades obtenidas de la purificación por miniprep no fueron suficientes para la realización de las pruebas de transfección, se empleó el kit GeneJET

Plasmid Maxiprep para obtener una mayor cantidad de plásmidos, de tal manera que se obtuvo suficiente cantidad para la realización de las pruebas. Los valores de la cuantificación son mostrados en la tabla 6.



Figura 7: Plásmidos purificados pCMV-GFP. Los plásmidos pCMV-GFP obtenidos de la transformación bacteriana y purificados con el kit GenJet Miniprep y se migraron en un gel de agarosa al 1%, en donde se aprecia una adecuada calidad de los productos.

Tabla 6: Cuantificación de los plásmidos pCMV-GFP purificados por miniprep y maxiprep

Plásmido	Concentración	Volumen	Cantidad total
Miniprep			
pCMV1	223 µg/mL	20 µL	4.46 µg
pCMV2	186 µg/mL	20 µL	3.72 µg
pCMV3	151 µg/mL	20 µL	3.02 µg
pCMV4	210 µg/mL	20 µL	4.2 µg
Maxiprep			
Maxi-CMV1	540 µg /mL	900 µL	486 µg
Maxi-CMV2	415 µg/mL	900 µL	373.5 µg

4.9 Análisis de expresión del gen reportero EGFP

Luego de la transfección in vivo de hemocitos de langostino con 10 µg del plásmido pCMV-GFP, se realizaron los ensayos para detectar la expresión del gen reportero EGFP mediante un ensayo de RT-qPCR utilizando los iniciadores qGFP2 y qGFP2. Se analizó la expresión de este gen a 12, 24 y 48 horas posteriores a la transfección y se consideró un grupo inyectado con la solución transfectante como control. Los resultados mostraron altos niveles de expresión a las 24 horas luego de la transfección ($p < 0.05$), a diferencia de

los niveles encontrados a las 12 y 48 horas, los cuales fueron muy cercanos a una expresión nula (Tabla 7; Figura 8). Por otro lado, la expresión encontrada en las muestras provenientes de langostinos inyectados solo con PEI fue nula. Estos datos indican que los niveles de transcritos empiezan a aumentar luego de las 12 horas hasta alcanzar un pico aproximadamente a las 24 horas y decaer drásticamente hasta ser casi nula a las 48 horas. Los análisis estadísticos mostraron una sobreexpresión significativa a las 24 horas sobre los demás tiempos.

Tabla 7: Análisis comparativo $\Delta\Delta Ct$ de la expresión relativa de EGFP luego de la transfección.

Tiempo post-transfeccion	Gen blanco	ΔCt promedio	$\Delta\Delta Ct$	RQ
PEI	EGFP			0
12 h	EGFP	3.548	3.548	0.085
24 h	EGFP	-5.540	-5.540	46.537
48 h	EGFP	9.073	9.073	0.001

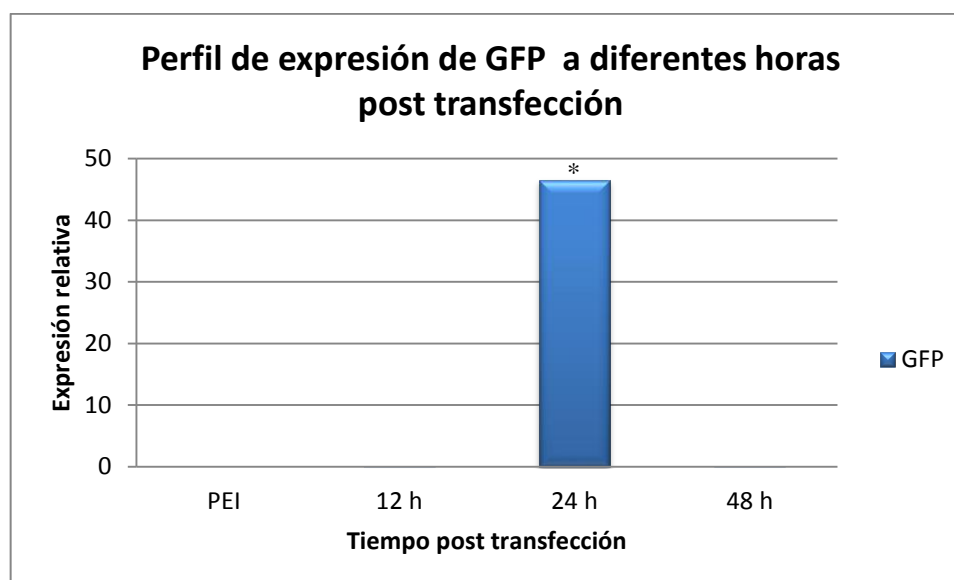
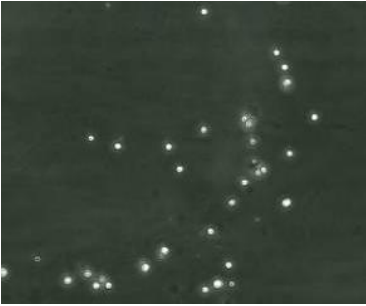

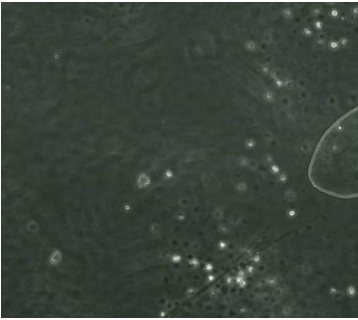



Figura 8: Niveles de expresión relativa de EGFP post transfección. Los análisis por PCR en tiempo real dirigidos al gen EGFP de los hemocitos analizados a 12, 24 y 48 horas después de la transfección con 10 μg de plásmido. La mayor expresión, comparación con los demás datos, fue obtenida a las 24 horas y fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

4.10 Ensayo por microscopia confocal

Los hemocitos provenientes de la transfección *in vivo* con 5 μg , 10 μg y 15 μg del plásmido pCMV-GFP fueron visualizados por microscopia confocal para determinar la variación de la expresión de la proteína EGFP según la cantidad de plásmido transfectedo. Para la realización de este análisis se revisaron por lo menos 500 células para cada tratamiento. Los resultados muestran que el tratamiento control (NaCl + PEI) no mostró hemocitos con fluorescencia. En el caso de la transfección con 5 μg de plásmido tampoco mostró fluorescencia en los hemocitos. Cuando se transflectaron 10 μg de plásmido se encontraron escasas células con fluorescencia de la misma manera que cuando se hizo con 15 μg , mostrando en éste último algunas células más con fluorescencia (Figura 9). Sin embargo, la cantidad de células con fluorescencia no fue representativa.

Tratamiento	Contraste de fase + GFP	GFP
Control		
Tratamiento 5 μg		

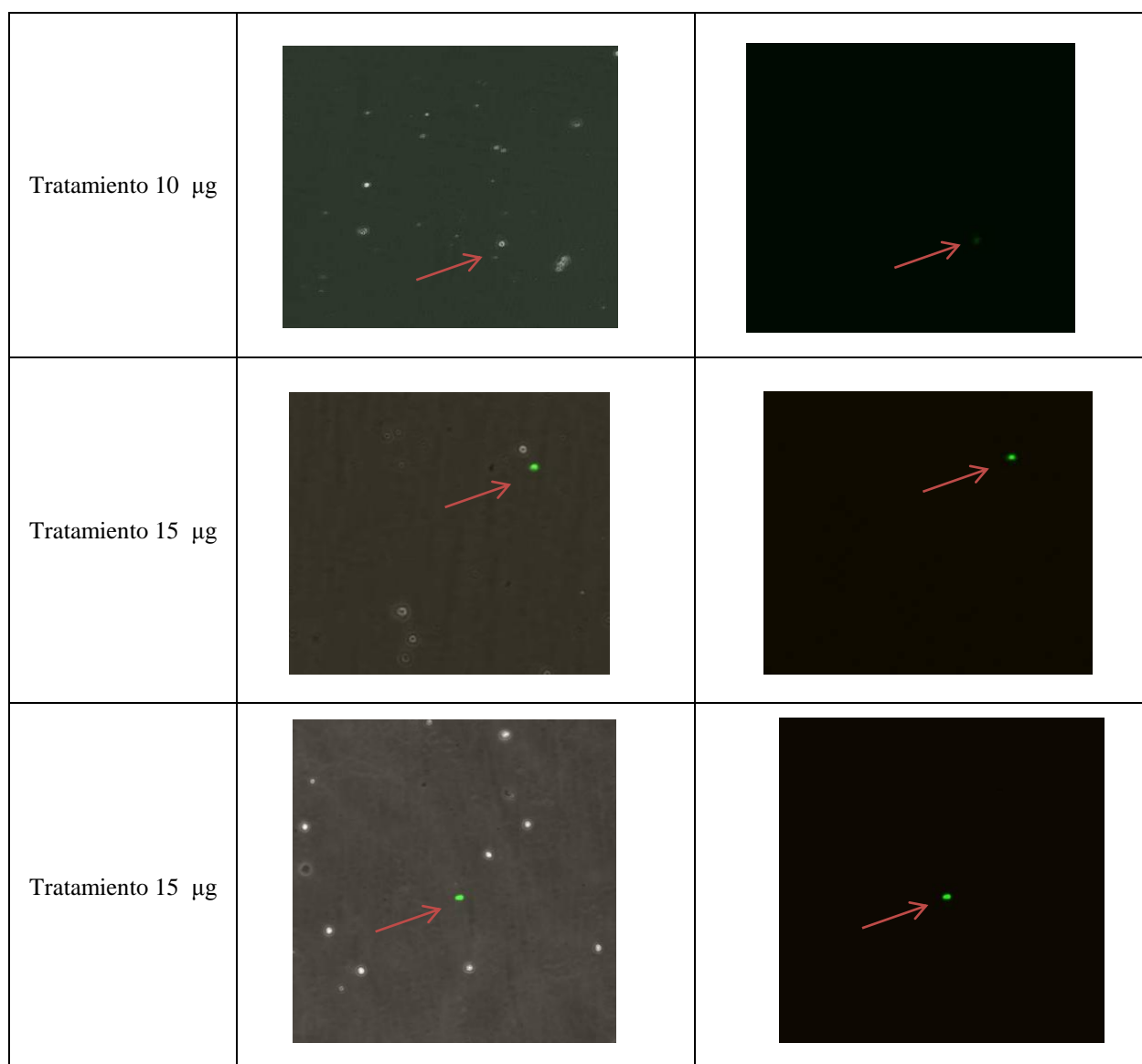


Figura 9: Imágenes de los hemocitos transfectados *in vivo* con diferentes concentraciones de pCMV-GFP. En el tratamiento control (PEI) y en el tratamiento con 5 μ g de plásmido no mostraron células con fluorescencia. En cambio, con 10 μ g y 15 μ g se observaron algunos hemocitos con fluorescencia correspondiente a GFP.

En el ensayo para determinar el efecto del tiempo de colecta de las muestras sobre la observación de la expresión de la proteína EGFP también se analizaron los hemocitos con el microscopio confocal. Los tiempos evaluados fueron 12, 24 y 48 horas después de la transfección, sin embargo, no se obtuvieron hemocitos después de la colecta de hemolinfa de los langostinos pertenecientes al grupo de 12 horas post transfección. Los resultados muestran hemocitos sin fluorescencia en el grupo de PEI (0 horas),

y escasas células con fluorescencia a las 24 y 48 horas, sin embargo, la cantidad de hemocitos con fluorescencia no fue representativa (Figura 10).

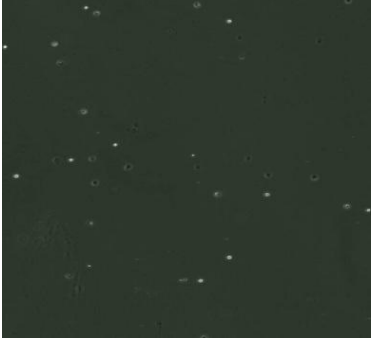
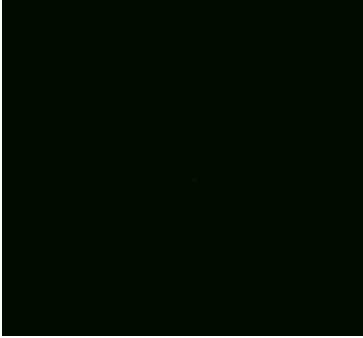
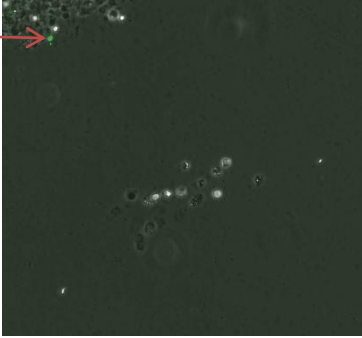
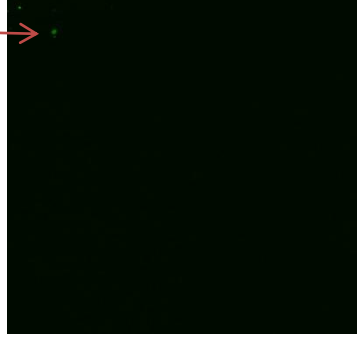
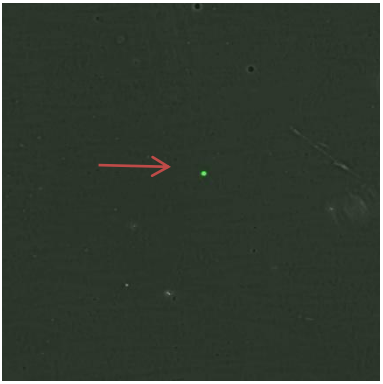
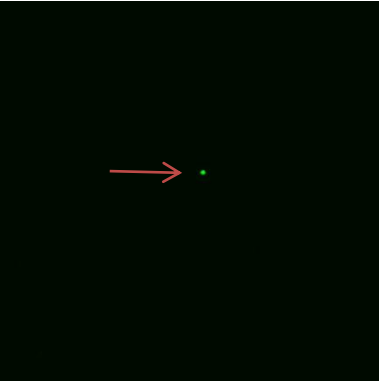
Tiempo post transfección	Contraste de fase + GFP	GFP
PEI (0 horas)		
24 horas		
48 horas		

Figura 10: Imágenes de los hemocitos transfectados *in vivo* con pCMV-GFP evaluados a diferentes tiempos de colecta post transfección: 0, 24 y 48 horas. A partir de las 24 horas post transfección se puede apreciar escasas células fluorescentes.

La determinación de las regiones blanco de los TALENs se realizó a partir de las secuencias de ADN_g obtenidas en el componente anterior. Se tomaron en cuenta 2 regiones blanco, la primera incluye un triplete codificante del aminoácido lisina, el cual es un motivo de unión al ADN. La segunda región corresponde a una codificante de motivos de oligomerización. Después de los análisis con el programa TALEN Targeter se obtuvieron múltiples opciones de las cuales se eligieron aquellas que ubicaban las regiones blanco de mutación en la parte del espaciador entre ambos dominios del TALENs (Tabla 8). Estas regiones para el reconocimiento de ADN por parte de los TALENs fueron ubicadas a pocos pares de bases una de la otra y un gran porcentaje fue en secuencias exónicas (Figura 11).

Tabla 8: Regiones blanco de TALENs sobre el gen Lvp53 y sus características

Nombre TALENs	RVDs izquierda	RVDs derecha	Secuencia blanco	ER de sitio único de corte en espaciador	% RVDs HD o NN/NH
TALEN1	NN HD NI NN NG NN NN NG NN HD NG NI HD NI NN NG HD NI NN NN	NI HD NN NN HD NI NI HD NI NG NG NG NN NN NN HD NI NN NI NN	T GCAGTGGTGCTA CAGTCAGG atctaggcaaactctac CTCTGCCCAAATG TTGCCGT A	Bfal:CTAG	56
TALEN2	NN HD HD NI HD HD NN HD NI HD NI NN NI NI HD HD NI NN NG NN	NI HD NG NG NG NN NI NI NG NI HD NG HD NG NG NN HD NI NN NG	T GCCACCGCACAG AACCAGTG aacaggtgctaca ACTGCAAGAGTAT TCAAAGT A	Ninguno	50

TTGCCTGGCTGACTCTACTCTGGCACATTCAGTGCCATCACTCCAGCCATGGGCAGGTCGTCACA
AATTCGGCATCTCCCTCCCAACTGGCAACAAAGATCGCAACAAGGTGTGCTGTGTTCAGAATTA
 TCTTTTRTGGGG **GCCTTTATGAATGGTGCTTG** TTCTTATTATTATCACTATGTAAGTGTAGTTCATT
 CCTGTGTATGGTACTGTCTGAACCTGTGCWTTATTATTTTGTTTTTAAAGGAACCTTTCTGAGAAW
 AAGGACAGWTTATGGACTAAGAATTAATTMTTGGTTTTTATGCATAGGAATTTGTATATTTAT
 AGTTTGCATATTTTTATTATGCAATRTTACTTGGTACTAATTAATATGAGAMTGCCAATCCARAC
 TGAAACTAACATRCTTTTGTCTGCAGTGGTGCTACAGTCAGGATCT **AGG** CAAACTCTACCTCTG
CCCAAATGTTGCCGTACCAGTGAATGTAACATTGGATGASTGGGTGAATGCTAACATCAYCATG
ACCCAGTGTTCAAGCAAAGCTGCCACCGCACAGAACCAGT GAACAGGTG **CTACAAC** **TGCAAG**
AGTATTCAAAGTA AGTGTWTARATGTYCTTTYTAACACTTTCCTTTYTTTTTTTTCCMTWTWTCT
 GTGGTATTACCARGSCAAGTTGTAAGGCAYTGAAAATATTTT **AGGTGTTTGCAAATGATGTG**
 ATTCATGTCTTTTTATTTTTAGATTGAAATAGAAAGGAATAATTTAAGATAAATTAAGTAATTT
 TATTCTTTCCCTCCTCCCTAGACTGTGATCCAAATTTGGCTGAGCATTAGTGCAGGTCGAGGG
TGA

Figura 11: Ubicación de las regiones blanco de TALENs sobre la secuencia del fragmento del gen Lvp53, producto de la unión de la Seq 1 y la Seq 2, donde los exones están subrayados. Las regiones sombreadas de color gris corresponden a las secuencias blanco izquierda y derecha del TALEN1. Las regiones sombreadas de amarillo corresponden a las secuencias blanco izquierda y derecha del TALEN2. Los sitios de unión a los iniciadores Mut están sombreados de celeste. Las secuencias encerradas en un cuadro corresponden a los motivos de unión al ADN de Lvp53: GGC, y de oligomerización (TAC, AAC, TGC y AGT).

4.12 Construcción de los plásmidos TALENs

La primera estrategia para la construcción de los plásmidos fue el ensamble mediante el kit EZ-TAL (System Bioscience). Pero no se obtuvieron los plásmidos finales codificantes de la proteína quimérica de TALENs. El proceso quedó detenido en la PCR de los multímeros, los cuales corresponden a la ligación de 6 fragmentos de ADN (Figura 12) correspondientes al diseño de RVDs realizado anteriormente. Luego de la amplificación por PCR para la construcción de TALEN 1 sólo se obtuvieron bandas correspondientes a los multímeros de la región izquierda L1, L2 y L3, pero para los multímeros de la región derecha se obtuvo una banda para R1 y una de menor intensidad para R2 pero no para R3 (Figura 12A). En la construcción de TALEN 2 se obtuvieron productos correspondientes a los multímeros de la región izquierda pero en la región de la derecha solo se obtuvo una banda correspondiente al fragmento R1 (Figura 12B).

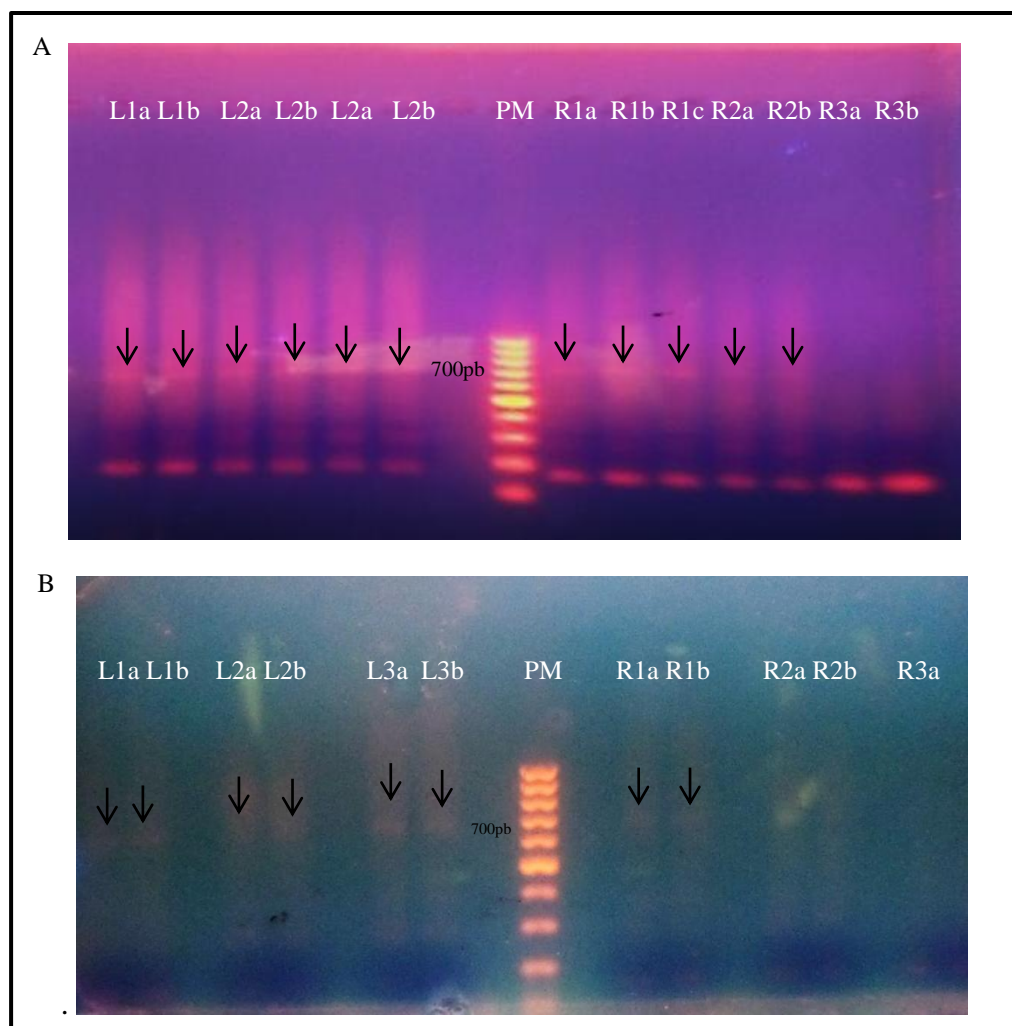


Fig. 12: Migración en un gel de agarosa al 1.5% de los multímeros correspondientes al kit EZ-TAL. A) Amplicones de multímeros del TALEN 1, se observan las bandas características alrededor de 700 pb en todos los fragmentos, pero en R3 no se observó banda. B) Amplicones de multímeros correspondientes a TALEN 2, se observó de manera similar a TALEN 1 que las bandas obtenidas fueron de un tamaño aprox. a 700 pb pero esta vez no se observaron bandas en R2 ni R3.

La segunda estrategia fue el envío a síntesis de los plásmidos correspondientes a cada región de reconocimiento del ADN. La síntesis fue realizada en GeneCopoeia y se obtuvieron 4 plásmidos, 2 denominados Tal1I y Tal1R, correspondientes al TALEN 1, y 2 denominados Tal2I y Tal2R, correspondientes al TALEN2 (región de la derecha e izquierda). Para determinar la calidad de los plásmidos estos fueron transformados en *E. coli* JM109 y purificados con el kit GeneJet plasmid miniprep. Los plásmidos fueron migrados en un gel de agarosa al 1% observando que los plásmidos

mantuvieron su integridad luego del procesamiento (Figura 13). Luego se realizó una purificación de plásmidos utilizando el kit GeneJET maxiprep y se obtuvo las cantidades necesarias para las transfecciones (Tabla 9).

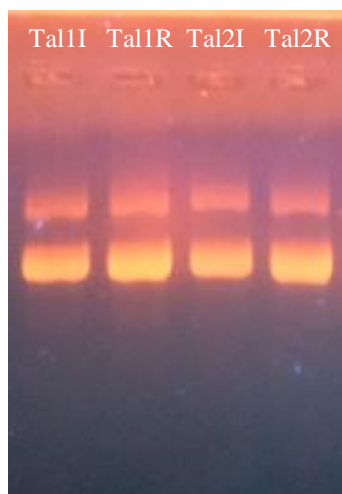


Figura 13: Migración de los plásmidos codificantes de TALENs en un gel de agarosa al 1% y revelado con bromuro de etidio mediante la luz UV. La migración permitió verificar la integridad de los plásmidos Tal1I, Tal1R, Tal2I y Tal2R.

Tabla 9: Cuantificación de los plásmidos de TALEN 1 y 2 purificados con el GeneJet miniprep y maxiprep.

Plásmido	Cantidad	Volumen
Mniprep		
Tal1I	19.42 µg	20 µL
Tal1R	18.12 µg	20 µL
Tal2I	15.16 µg	20 µL
Tal2R	50.22 µg	20 µL
Maxiprep		
Tal1I	614 µg	1 mL
Tal1R	499 µg	1 mL
Tal2I	580 µg	1 mL
Tal2R	605 µg	1 mL

4.13. Evaluación de las mutaciones

Luego de la transfección *in vivo* de los plásmidos TALENs los hemocitos fueron colectados para determinar la presencia de mutaciones en la región blanco de TALENs por una amplificación por PCR con los iniciadores

MutF y MutR flanqueantes de esta región. Previa a esta prueba se realizó una estandarización de los iniciadores, mostrando el éxito en la obtención de productos de PCR a partir de muestras de ADNg de hemocitos (Fig. 14). Para la realización del análisis de las muestras transfectadas con TALENs, se realizó una colecta de hemolinfa previa a la inyección de los plásmidos y luego una colecta posterior, de tal manera que se pueda comparar los resultados por individuo. Sin embargo, las amplificaciones por PCR de las muestras de hemocitos con estos iniciadores no fueron exitosas en la obtención de amplicones. Debido a esto no se pudo realizar los análisis moleculares de las muestras para determinar la presencia de mutaciones.

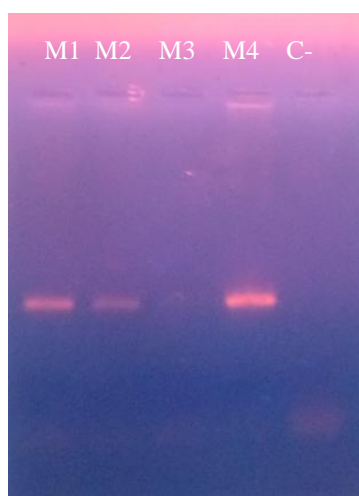


Figura14: Estandarización de la amplificación por PCR de las muestras de ADN de hemocitos con los iniciadores MutF y MutR. Todas las muestras mostraron un amplicón a excepción del control negativo, verificando así las condiciones utilizadas para la amplificación.

4.14. Análisis citológico de los hemocitos

Los hemocitos colectados de los langostinos transfectados con los plásmidos codificantes de TALENs fueron observados al microscopio después de ser teñidos con el colorante Giemsa. Los hemocitos observados de las muestras de tipo control (inyección sólo con PEI) mostraron un núcleo de tamaño similar en todas las células con un citoplasma claro y un tamaño celular homogéneo. En el caso del tratamiento con los plásmidos codificantes de TALEN 1, la tinción de hemocitos montados en una lámina mostró

morfologías similares a las observadas en los hemocitos del control, con núcleos homogéneos y de tamaño celular similar, lo que indica que no hubo algún cambio significativo relacionado a la mutagénesis dirigida. La observación de los hemocitos transfectados con los plásmidos para TALEN 2, indicó la presencia mayoritaria de las células con morfología similar a los tratamientos anteriores, sin embargo, también se identificaron algunas células de tamaño más grande, con un citoplasma más denso y un núcleo ligeramente más grande. Este resultado indicaría que podría haber una alteración en la morfología celular relacionada a la mutagénesis, sin embargo, la cantidad de células de este tipo es poco significativa (Figura 15) y la morfología podría ser un indicador de células reactivas.

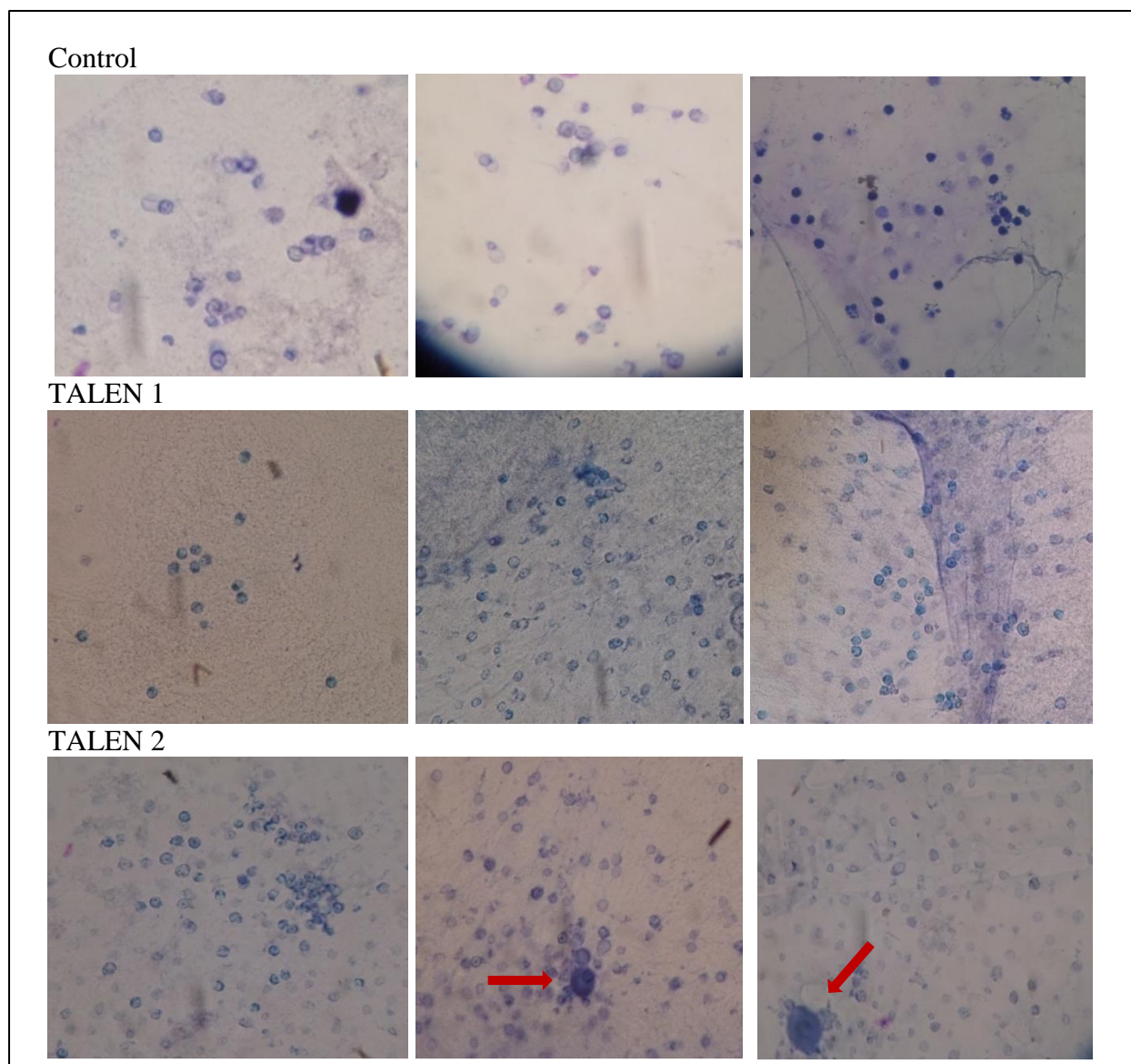


Figura 15: Observación al microscopio de luz (400X) de los hemocitos colectados de los animales transfectados con TALEN 1 y TALEN 2. No se observan cambios significativos entre el control y los hemocitos con TALEN1, pero sí células con diferente morfología en el tratamiento con TALEN 2 señaladas por flechas rojas.

5. DISCUSIÓN.

La organización genética de los genes en organismos eucariotas acepta la presencia de regiones exónicas e intrónicas. Los exones son las secuencias que tienen la parte codificante del gen y en algunos casos ciertos sitios que intervienen en la regulación de la expresión. Las secuencias intrónicas, son consideradas de gran importancia debido a su participación en el inicio, finalización de la transcripción, la ocurrencia del corte y empalme alternativo y la organización del genoma (Black 2003; Chorev and Carmel 2012; Kabat *et al.* 2006; Li *et al.* 2012).

Los organismos eucariotas poseen varios genes que contienen secuencias intrónicas en su interior, las cuales son eliminadas del ARNm maduro por un proceso denominado corte y empalme (splicing). Este proceso es llevado a cabo por un complejo de proteínas llamado espliceosoma conformado por un grupo de pequeños ARNs, ribonucleoproteínas y otros factores que permiten la extracción de una secuencia ubicada entre un sitio donador y un aceptor (Nilsen 2003; Will and Lührmann 2011). Por otro lado, existen un grupo de intrones, que son eliminados por un proceso de corte y empalme autónomo, sin necesidad del espliceosoma (Vicens *et al.* 2008; Toor *et al.* 2008).

A pesar de que el langostino es uno de los principales recursos aprovechados en la acuicultura a nivel mundial, aún no se ha reportado la secuencia del genoma completo de alguna de las diferentes especies y aún se desconoce mucho acerca de innumerables procesos celulares. El gen codificante de p53, ha sido estudiado principalmente en las especies de mamíferos debido a su relación con la regulación del ciclo celular y los procesos de apoptosis, además de su utilidad en la obtención de líneas celulares y estudios relacionados con el cáncer (Kamiya *et al.* 2002; Komine *et al.* 2012; Goh, Coffill, and Lane 2011). Debido a esto, en langostinos se ha comenzado a realizar estudios sobre este gen y su participación en procesos de respuesta al estrés. Sin embargo, sólo se ha caracterizado la secuencia

del ADNc (Qian *et al.* 2014) en la cual se sugieren posibles sitios de importancia funcional de Lvp53, pero no se ha determinado la estructura exón/intrón del gen, a pesar de haberse reportado en humanos la importancia de los intrones p53 con su actividad (Sadeghi *et al.* 2013; Thongsuksai *et al.* 2010; Trejo-Becerril *et al.* 2000).

A partir de la amplificación por PCR del ADNg y de ADNc de *Litopenaeus vannamei* utilizando iniciadores basados en la secuencia reportada anteriormente (Qian *et al.*, 2014) obtuvimos algunos amplicones que luego de ser secuenciados y contrastados con secuencia del ADNc del gen Lvp53 almacenada en el GenBank se pudo identificar 3 regiones portadoras de 3 posibles intrones (datos no mostrados). Debido a la ubicación de los intrones, en este estudio nos centramos en las dos regiones aledañas a los motivos de interés.

Adicionalmente se realizó un análisis informático de las secuencias obtenidas y se determinaron posibles sitios donadores y aceptores que coincidieron con los extremos de los potenciales intrones con las secuencias consenso GT en el sitio donador y AG en el sitio aceptor, de acuerdo a lo reportado por Kent y Zahler (Kent and Zahler 2000). Estos resultados confirmaron la presencia de regiones intrónicas en el gen Lvp53 tal como se han reportado en los homólogos de especies como humanos (Soussi and May 1996), peces (Piasecka *et al.* 2015), insectos (Ou *et al.* 2007; Ollmann *et al.* 2000) y moluscos (Farcy *et al.* 2008), sin embargo, aún se desconoce de la organización exón–intrón completa del gen Lvp53.

Los polimorfismos en intrones están asociados con variaciones en la expresión de la proteína y en algunos casos en el destino final como fue reportado en la hormona del crecimiento en humanos 1 (GH1) (Millar *et al.* 2010) y que en otros casos puede aumentar la sensibilidad a enfermedades (Do *et al.* 2010; Kwok *et al.* 2005; Shen *et al.* 2010). Por otro lado, se ha utilizado los polimorfismos de longitud en intrones para determinar la variabilidad entre especies dentro del grupo de penaeideos (Bierne *et al.*

2010). En el gen Tp53 de humanos también se han reportado polimorfismos relacionados con enfermedades, en especial una duplicación de un fragmento pequeño en el intrón 3 (Wang-Gohrke *et al.* 2002; Morten *et al.* 2016) y en el intrón 7 (Sailaja *et al.* 2012).

En la presente investigación, los polimorfismos encontrados en los intrones A y B corresponden a sustituciones nucleotídicas y de tipo inserción/delección. Esto concuerda con el estudio de polimorfismos en *Drosophila*, en donde se indica que las regiones no codificantes también están bajo presión selectiva, lo que pudo originar esta variación (Ometto, Stephan, and De Lorenzo 2005). El intrón A posee una mayor conservación dentro de la misma especie en comparación con el grado de conservación del intrón B que posee poco más del 50 %, lo que podría indicar la existencia de elementos reguladores de mayor importancia en el intrón A y que ambos intrones han estado bajo diferentes presiones de selección. Además, las delecciones que son de tamaño corto pueden fijarse en la secuencia intrónica ya que no son deletéreas a diferencias de cambios grandes en la secuencia que son desfavorables por selección natural (Parsch 2003).

Se han analizado los posibles de sitios reguladores de la transcripción y del proceso de splicing alternativo que pueden encontrarse en el intrón. Los sitios encontrados en ambos intrones son (A/U)GGG, el cual potencia el splicing alternativo (Sirand-Pugnet *et al.* 1995), permitiendo la aparición de transcritos diferenciales de acuerdo al tejido (Brudno *et al.* 2001). El motivo AATAAA encontrado en ambos intrones ha sido identificado en *Drosophila* como un regulador del splicing en el extremo 3' (Soller and White 2003). También se ha encontrado el motivo TTT en una gran cantidad en ambos intrones, esta repetición ha sido vinculado anteriormente a la regulación negativa del splicing del gen del precursor de la proteína amiloide (Shibata *et al.* 1996), sin embargo, no hay más referencia acerca de este motivo por lo que se necesitaría más estudios para confirmar su participación. Otro triplete encontrado ha sido CTG, este triplete ha sido reportado ser importante en el splicing del ARNm de DMPK (Tiscornia and Mahadevan 2000) debido a su

capacidad de secuestrar a factores de splicing de ARN (Warf and Berglund 2007). Finalmente, se identificaron las secuencias de tipo YCAY las cuales permiten la unión de los factores de transcripción NOVA en mamíferos (Ule *et al.* 2006) y de su homólogo Pasilla en *Drosophila* (Brooks *et al.* 2011).

También se han encontrado sitios de regulación de la transcripción, como GGATTGGC, el cual posee una secuencia CCAAT invertida que ha sido relacionada con la unión de factores de transcripción (Farnham and Means 1990). Sin embargo, estos han sido reportados en los intrones más cercanos al promotor, así que probablemente no serán funcionales en los intrones del presente estudio por estar en la región intermedia del gen (Gilthorpe *et al.* 2002). También se ha identificado el sitio CACCTA, conocido como motivo uE5, el cual es una secuencia de unión a represores de la transcripción (Kamachi and Kondoh 1993). Otros elementos reguladores del proceso de splicing han sido reportados anteriormente, por ejemplo, la repetición GGG (Brudno *et al.* 2001), regiones ricas en purinas (Hastings, Wilson and Munroe 2001) y el tramo de polipirimidina que puede reprimir el splicing (Sawicka *et al.* 2008), así también el triplete CCC (Majewski and Ott 2002). Además, se han reportado las repeticiones CA que pueden incrementar el splicing (Hung *et al.* 2008).

Existen elementos silenciadores de tipo exónicos e intrónicos que son blanco de proteínas represoras del splicing, ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas, mediante el bloqueo de la maquinaria de splicing (Martinez-Contreras *et al.* 2008; Black 2003), los cuales son equilibrados por la presencia de elementos potenciadores y de los factores trans-splicing. En este estudio se determinaron posibles regiones de tipo silenciadores, encontrando una mayor posibilidad de estar presentes en el intrón A que en el B. De acuerdo a estos resultados se podría sugerir la posibilidad de un evento de splicing alternativo en el que se retenga el intrón, obteniendo una forma alterna del transcrito tal como se ha reportado en algunos genes en humanos (Carstens, Wagner and Garcia-Blanco 2000; Wagner *et al.* 2005). Sin

embargo, se necesitan estudios futuros que confirmen empíricamente la función de estos sitios.

Por otro lado, la gran mayoría de organismos poseen mecanismos de respuesta a diferentes tipos de estrés, los cuales incluyen variaciones en los niveles de expresión de diferentes genes y cambios en las actividades de algunas proteínas como p53, una proteína involucrada en respuesta al estrés celular en un amplio rango de especies para proteger al organismo mediante la activación del proceso de muerte celular programada en las células dañadas (Perry 2010).

Los langostinos son animales exotérmicos por lo que el estrés térmico en langostinos afecta en gran medida la fisiología del animal (Bett and Vinatea 2009) y a la expresión de diferentes genes, por ejemplo, los genes codificantes de proteínas de shock térmico (Qian *et al.* 2012) y otras proteínas relacionadas con la respuesta a radicales libres (Zhu and Yao 2015) lo que da soporte a los resultados de variación de la expresión de p53. Además, el estudio del efecto de la temperatura en los langostinos es importante ya que se ha reportado que los langostinos cultivados a 32°C o 33°C inhiben en gran medida la replicación del virus WSSV por efectos directos en este proceso o por aumento del sistema inmune y reducen así las tasas de mortalidad (Rahman *et al.* 2006; Granja *et al.* 2006; Vidal *et al.* 2001).

Los resultados en el presente estudio mostraron que los langostinos expuestos a variaciones de temperaturas de manera gradual y por choque térmico inducen a cambios en la expresión del gen Lvp53, indicando la participación de este gen en la respuesta al estrés celular por un incremento o disminución de la temperatura. Estos resultados están de acuerdo con el comportamiento entre la proteína p53 reportada en humanos, donde se ha demostrado que las variaciones de temperatura, tanto el aumento como la reducción, conducen a un incremento de la expresión de p53 (Gu *et al.* 2014; Nitta *et al.* 1997; Chen, Lin-Shiau and Lin 1999). Además, se ha reportado que un incremento grande de temperatura en el ambiente de los langostinos

conduce a un consumo rápido del oxígeno (Schmidt-Nielsen 2000) y debido a que en células humanas se ha encontrado que p53 regula la respiración celular y que la pérdida de su función conduce a una reducción del consumo de oxígeno (Matoba *et al.* 2006; Hu *et al.* 2010), este consumo rápido de oxígeno en langostinos podría estar relacionado a la elevación de la expresión de Lvp53. Adicionalmente, la relación entre el estrés térmico y la activación de la apoptosis, y el incremento de la expresión de p53 inducida por la apoptosis (Chan *et al.* 2000), da soporte al incremento de los niveles de Lvp53 en langostino cuando se aumenta la temperatura.

En la primera prueba de variación de temperatura se muestra que la reducción gradual de la temperatura hasta 25°C induce un aumento de la expresión de p53, sin embargo, este incremento es menor al obtenido cuando los langostinos son expuestos a un incremento gradual de la temperatura hasta 33°C o 35°C. Adicionalmente, se observó que el nivel de expresión obtenido a 33°C fue mucho mayor al obtenido de los animales a 35°C, estos resultados no estuvieron de acuerdo con los obtenidos en moluscos, donde se reportó que a mayor variación de temperatura, mayor es la expresión de Lvp53 (Yao and Somero 2013). Este resultado pudo ser debido a que el tiempo requerido para llegar a 35°C fue mayor (aproximadamente 40 minutos más) que el tiempo que tomó en llegar a 33°C y se ha reportado en células humanas que los niveles de expresión de p53 se incrementan al comienzo de la hipertermia y luego van disminuyendo (Guan *et al.* 2002).

En el segundo ensayo, en el cual se realizó un cambio de temperatura del agua inmediato, de 28°C a 21°C o a 37°C, se observó un nivel de expresión más alto cuando se colocaron los langostinos a una temperatura mayor a la habitual que a una temperatura menor. Esto concuerda con la capacidad del langostino para resistir varios grados por debajo de su temperatura normal (Kumlu, Türkmen and Kumlu 2010).

Sin embargo, según la prueba estadística las diferencias entre las expresiones relativas obtenidas en las pruebas de estrés térmico gradual y

por choque térmico no fueron significativas. Esto puede ser debido a la gran desviación observada en los valores del ΔCt en cada grupo. La gran desviación obtenida puede ser causada por la falta de réplicas técnicas en el estudio y por la pequeña cantidad de datos analizados, pero también, podría significar que existe una variación individual natural en la capacidad de respuesta al estrés térmico (Ebrahimi *et al.* 2014; Nakamura *et al.* 2016). Otro posible factor de la alta variación podría ser el uso del gen Ef1 alpha como normalizador, ya que no se encontraron reportes del uso de este gen en langostinos bajo estrés térmico, pero sí bajo otro tipo de estrés (Dhar *et al.* 2009; Chen *et al.* 2014), aunque en otras especies acuícolas como el bacalao del Atlántico sí fue utilizado como gen de referencia en evaluaciones de estrés térmico (Aursnes *et al.* 2011).

En una siguiente etapa de este estudio se eligió el plásmido pCMV-GFP debido a la presencia del promotor del gen IE del Citomegalovirus, el cual ha sido muy utilizado en diferentes ensayos de expresión recombinante debido al amplio rango de funcionalidad y sus altas tasas de expresión (Xia *et al.* 2006). En langostinos ha sido reportada anteriormente la utilización de este promotor dentro de un vector demostrando la capacidad de expresión en células de langostino (Tseng *et al.* 2000; Rout *et al.* 2007; Kumar, Ishaq-Ahamed and Sarathi 2008). Sin embargo, otro estudio del mismo promotor reportó una menor eficiencia de expresión al ser comparado con un promotor del virus de langostino IHNV (Dhar *et al.* 2007) cuando se probaron en langostinos, lo que podría explicar la baja eficiencia del promotor CMV en langostinos. Además, se eligió el gen reportero codificante de la proteína verde fluorescente para las pruebas debido a la capacidad para visualizar la presencia de la proteína utilizando un microscopio confocal en muchos tipos celulares (Hoffman 2015) incluyendo células de langostino (Calderon 2004).

El agente transfectante seleccionado para las pruebas fue un polipéptido, el PEI 25 KDa. Este permite la entrada del ADN al espacio intracelular mediante vesículas endosomales, además, provee un pH fisiológico que sirve como buffer en el interior del lisosoma previniendo la lisis

del ADN. Los policondensationes se unen por fuerzas electrostáticas, generando complejos de aproximadamente 100 nm con 3 a 4 moléculas plasmídicas muy condensadas (Pichon, Billiet and Midoux 2010).

El primer ensayo realizado consistió en evaluar la relación entre la concentración del plásmido y cantidad del agente transfectante inyectado *in vivo* con la expresión del agente reportero. Los resultados obtenidos de la observación al microscopio confocal muestran escasas células con la fluorescencia emitida por la proteína GFP en los tratamientos de 10 µg y 15 µg de plásmido pero no cuando se usó 5 µg. Esto indica que la expresión de la proteína GFP tiende a aumentar cuando se agrega mayor cantidad de plásmido, aun así, las diferencias no fueron significativas.

En el segundo ensayo se evaluó la variación de la expresión de la proteína GFP a diferentes tiempos post transfección obteniéndose escasas células con emisión de fluorescencia así que no se pudo obtener diferencias significativas en las diferentes horas de colecta. Los altos niveles de expresión a 24 horas luego de la transfección y luego una caída a las 48 horas muestran una previa acumulación de ARNm correspondiente al gen reportero, la cual disminuye significativamente debido probablemente a una degradación del plásmido o producto de los mecanismos reguladores de expresión. A nivel de proteína el resultado fue concordante al reporte de transfección de células espermáticas con un plásmido portador de la proteína GFP gobernada por el promotor CMV, en el cual se evaluó la expresión a las 24 y 48 horas sin encontrar diferencias significativas entre la cantidad de células portadoras de la fluorescencia y, además, se encontró fluorescencia en los hemocitos que no fueron transfectados con el plásmido (Calderon 2004).

El pobre nivel de expresión de la proteína GFP podría deberse a que la transfección química puede ser inhibida por componentes del suero (Kikuchi *et al.* 1999) mediante la disminución de la cantidad de complejo ADN-lípidos (Gao and Huang 1995) o la disminución de la fuerza de atracción del lípido con el ADN por competición con proteínas del suero (Yang and Huang 1998).

Esto sugiere que en la hemolinfa de langostinos podrían existir componentes similares que inhiban la transfección. Por otro lado, la observación de los hemocitos en el microscopio confocal se realizó normalizando la intensidad del láser de emisión para evitar obtener fluorescencia en el control. Con estos parámetros se observaron las muestras transfectadas lo que podría haber impedido la observación de células con baja fluorescencia, a pesar de estos ajustes se obtuvieron algunas células con gran intensidad de fluorescencia.

El gen *Lvp53* ha sido caracterizado en los últimos años en el langostino *L. vannamei*, demostrando su relación con la respuesta al estrés abiótico y provocado por infecciones (Qian *et al.* 2014; Gong, Ju and Zhang 2015; Huang *et al.* 2015). En vertebrados se ha demostrado la participación de p53 en el control del ciclo celular (Vousden and Lu 2002) y se ha reportado la inmortalización celular debido a mutaciones en el gen p53 (Isaka 2003; Komine *et al.* 2012; Wu *et al.* 2013). En langostinos aún no se ha demostrado la relación de la deficiencia de la proteína *Lvp53* con alteraciones en el ciclo celular que puedan llevar a un crecimiento descontrolado, lo que puede ser aprovechado para la obtención de líneas celulares. Actualmente las técnicas en ingeniería genética han evolucionado y en la actualidad las tecnologías de edición genómica permiten la obtención de mutaciones en sitios específicos (Doudna and Gersbach 2015).

En el presente trabajo se emplearon los TALENs para inducir una mutagénesis dirigida al gen *Lvp53*. Los TALENs han sido utilizados por muchos investigadores debido a la gran especificidad para generar mutaciones a diferencia del sistema CRISPR/Cas9 (Falahi, Sgro and Blancafort 2015), sin embargo, la construcción de los plásmidos es más compleja que con CRISPR.

En el presente trabajo se ha evaluado la mutagénesis dirigida por TALENs homodiméricos dirigidos al gen p53 del langostino *Litopenaeus vannamei*. El diseño de las regiones blanco de los TALENs fue logrado gracias a la determinación de la estructura exón intrón en el componente

anterior, ya que estas tijeras moleculares actúan sobre la doble cadena de ADN. Los criterios utilizados para el diseño de los TALENs se basaron en las reglas de Doyle (Doyle *et al.* 2012), tal como lo realizaron en la pulga de agua (Naitou *et al.* 2015) y en el pez ciego (Ma *et al.* 2015). En este contexto se escogió el programa TALEN Targeter ya que contiene como opción el uso de los criterios propuestos por Doyle.

Acerca de las estrategias utilizadas para la construcción de los TALENs, fueron utilizadas dos: la construcción con un kit de ensamble EZ-TAL y por síntesis directa. En un comienzo se optó por la primera estrategia, sin embargo, no fue exitosa para la obtención de los plásmidos finales, siendo el principal motivo la imposibilidad de conseguir 2 multímeros para el ensamble de la región de reconocimiento derecho de los TALENs, un paso fundamental para el ensamble de los plásmidos. Esto pudo tener origen en un problema en la reacción con exonucleasa anterior a la PCR del multímero o la mantención de la enzima y los ATPs (Uhde-Stone *et al.* 2013). Además, debido a la reducida cantidad de reacciones del kit y la dificultad para su adquisición no se pudo continuar. Debido a lo anteriormente descrito, se optó por el envío del diseño informático de los plásmidos a ser sintetizados por la empresa GeneCopoeia, obteniendo los plásmidos codificantes de TALENs.

En la siguiente etapa los vectores de TALENs fueron utilizados para obtener un evento de mutagénesis *in vivo* en el gen p53 el cual se planteó analizar a nivel morfológico y molecular. En el caso de los análisis a nivel molecular, éstos no pudieron ser realizados debido a problemas en la extracción de hemocitos de langostinos de pequeño tamaño, ya que la cantidad celular inicial fue muy baja lo que afectó la PCR que si fue estandarizada, pero con cantidades mayores de hemocitos. En consecuencia, se realizaron sólo los análisis morfológicos, pero no se obtuvo algún cambio significativo en las muestras provenientes de los tratamientos con los plásmidos codificantes de TALEN1 con el control y en el caso de TALEN2 se observó la misma morfología a excepción de escasas células con un tamaño y densidad diferente. Las causas probables de estos resultados podrían ser: la

baja eficiencia de transfección, demostrada en la prueba anterior, predominancia de mutaciones sin efecto sobre la funcionalidad de la proteína, o la necesidad de mayor cantidad de repeticiones

Estudios de células cancerosas en moluscos han mostrado que son completamente indiferenciadas, presentan una monotonía en su morfología, con una proporción de núcleo citoplasma de 1:1 a diferencia de las normales 1:10, carencia de pseudópodos y una pobre fijación a la lámina (Walker, Low, and Böttger 2012; Walker *et al.* 2009). Además, un estudio de los hemocitos normales en *P. monodon* demuestran que las células granulares pueden ser el doble de tamaño que una hialina (Sung and Sun, 2002) y que cuando existen partículas extrañas los hemocitos pueden variar su tamaño para realizar la fagocitosis (Kakoolaki *et al.* 2010). Debido a esto, las células de morfología diferente encontradas en el grupo de TALEN2 probablemente correspondan a hemocitos granulares, los que poseen el citoplasma denso y una proporción de núcleo citoplasma menor o hemocitos que reaccionan ante partículas extrañas (agente transfectante), mas no cumple las características de los hemocitos cancerosos descritos en moluscos. A pesar de ello la aplicación exitosa de las pruebas moleculares será muy importante para la determinación de mutaciones.

6. CONCLUSIONES.

Del presente estudio realizado sobre el gen Lvp53 de langostino y las metodologías de transfección y mutagénesis dirigida se concluye lo siguiente:

- La estructura del gen Lvp53 del langostino *Litopenaeus vannamei* consta de regiones exónicas y de más de una región intrónica con diferentes grados de polimorfismos, indicando la ocurrencia del splicing en este gen.
- Además, existen posibles sitios reguladores de la expresión del gen en las secuencias intrónicas, sin embargo, estos sitios deben ser confirmados por ensayos *in vitro*.
- En condiciones de estrés por variaciones graduales de la temperatura, el gen Lvp53 presenta un incremento, poco significativo estadísticamente, ante un aumento o reducción de la temperatura.
- En el caso de variaciones drásticas de la temperatura del agua, el gen Lvp53 también incrementó con una baja significancia estadística su expresión como respuesta al estrés.
- En referencia a las metodologías de transfección *in vivo* de hemocitos del langostino, se concluye que ésta permitió la detección del gen reportero introducido, y que un aumento en la concentración permitió mejorar la sensibilidad de la detección de la proteína GFP.
- Además, la mayor expresión de EGFP luego de una transfección de pCMV-GFP en hemocitos fue obtenida a las 24 horas post-transfección.
- La metodología de detección de la proteína GFP en muestras de langostino por microscopía confocal es poco eficiente debido a la reducida sensibilidad para detectar pequeñas concentraciones de proteína.
- Sobre la mutagénesis dirigida al gen Lvp53 mediada por TALENs se ha demostrado la factibilidad de construir estas enzimas dirigidas a sitios de importancia funcional. Sin embargo, aún no se ha podido evaluar completamente su eficiencia para generar una mutación.

7. RECOMENDACIONES.

- Realizar una investigación centrada sólo en la caracterización completa del ADNg del gen Lvp53 y evaluar la existencia de variantes de transcritos de este gen.
- Utilizar un ADNg de buena calidad para las evaluaciones de caracterización de secuencia.
- Evaluar la unión de factores de transcripción a los posibles sitios funcionales encontrados en los intrones y el efecto de inhibidores de estos sitios sobre el splicing.
- Utilizar una muestra grande de langostinos para obtener resultados más representativos.
- Evaluar la expresión del gen Lvp53 ante otro estrés de tipo abiótico que afecte al cultivo de los animales, para demostrar su participación y dar soporte a esta investigación.
- Caracterizar más proteínas involucradas con la vía de apoptosis de Lvp53 en langostinos.
- Utilizar vectores con otros promotores funcionales en langostinos para los ensayos de transfección en hemocitos.
- En los ensayos de mutagénesis dirigida a p53 de langostino, se deberá utilizar más repeticiones para el ensayo y estandarizar exitosamente las pruebas moleculares para la detección de mutaciones producidas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Aguirre-Guzmán, G., J.G. Sánchez-Martínez, A.I. CampaCórdova, A. Luna-González, and F. Ascencio. 2009. Penaeid shrimp immune system: a minireview. *Thai J. Vet. Med.* 39: 205-215..
- Ahanger, S., S. Sandaka, D. Ananad, M. K. Mani, R. Kondadhasula, C. S. Reddy, M. Marappan, R. K. Valappil, K. C. Majumdar, and R. K. Mishra. 2014. Protection of shrimp *Penaeus monodon* from WSSV infection using antisense constructs. *Marine biotechnology* 16(1): 63-73.
- Aljanabi, S. M., and I. Martinez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25(22): 4692-4693.
- Amundson, S. A., T. G. Myers, and A. J. Fornace Jr. 1998. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. *Oncogene* 17(25): 3287.
- Aryan, A., M. A. E. Anderson, K. M. Myles, and Z. N. Adelman. 2013. TALEN-Based Gene Disruption in the Dengue Vector *Aedes aegypti*. *PLoS ONE* 8(3): e60082.
- Aursnes, I. A., A. L. Rishovd, H. E. Karlsen, and T. Gjøen. 2011. Validation of reference genes for quantitative RT-qPCR studies of gene expression in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) during temperature stress. *BMC research notes* 4(1): 104.
- Baralle, D., and M. Baralle. 2005. Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *Journal of medical genetics* 42(10): 737-748.
- Bauer, J. H., P. C. Poon, H. Glatt-Deeley, J. M. Abrams, and S. L. Helfand. 2005. Neuronal expression of p53 dominant-negative proteins in adult *Drosophila melanogaster* extends life span. *Current biology: CB* 15(22): 2063.
- Beckerman, R., and C. Prives. 2010. Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(8): a000935.
- Bett, C., and L. Vinatea. 2009. Combined effect of body weight, temperature and salinity on shrimp *Litopenaeus vannamei* oxygen consumption rate. *Brazilian Journal of Oceanography* 57(4): 305-314.

- Bienz, B., R. Zakut-Houri, D. Givol, M. Oren, R. Zakut-Houri, M. Oren, B. Bierni et al. 1984. Analysis of the gene coding for the murine cellular tumour antigen. *EMBO J* 3(9): 2179-2183.
- Bierni, N., S. A. Lehnert, E. Bedier, F. Bonhomme, and S. S. Moore. 2000. Screening for intron-length polymorphisms in penaeid shrimps using exon-primed intron-crossing (EPIC)-PCR. *Molecular Ecology* 9(2): 233-235.
- Black, D. L. 2003. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual review of biochemistry* 72(1): 291-336.
- Bogdanove, A. J., and D. F. Voytas. 2011. TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science* 333(6051): 1843-1846.
- Boggs, K., and D. Reisman. 2006. Increased p53 transcription prior to DNA synthesis is regulated through a novel regulatory element within the p53 promoter. *Oncogene* 25(4): 555-565.
- Boldrini, L., S. Gisfredi, S. Ursino, M. Lucchi, G. Greco, A. Mussi, V. Donati, and G. Fontanini. 2008. Effect of the p53 codon 72 and intron 3 polymorphisms on non-small cell lung cancer (NSCLC) prognosis. *Cancer investigation* 26(2): 168.
- Boussif, O., F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, and J. P. Behr. 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(16): 7297-7301.
- Brodsky, M. H., W. Nordstrom, G. Tsang, E. Kwan, G. M. Rubin, and J. M. Abrams. 2000. *Drosophila* p53 binds a damage response element at the reaper locus. *Cell* 101(1): 103.
- Brooks, A. N., L. Yang, M. O. Duff, K. D. Hansen, J. W. Park, S. Dudoit, S. E. Brenner, and B. R. Graveley. 2011. Conservation of an RNA regulatory map between *Drosophila* and mammals. *Genome research* 21(2): 193-202.
- Brož, D. K., and L. D. Attardi. 2010. *In vivo* analysis of p53 tumor suppressor function using genetically engineered mouse models. *Carcinogenesis* 31(8): 1311-1318.
- Brudno, M., M. S. Gelfand, S. Spengler, M. Zorn, I. Dubchak, and J. G. Conboy. 2001. Computational analysis of candidate intron regulatory elements for

- tissue-specific alternative pre-mRNA splicing. *Nucleic acids research* 29(11): 2338-2348.
- Calderon, F. 2004. *Transfection reagent-mediated gene transfer for the Pacific white shrimp Litopenaeus vannamei*. Tesis Master of Science in Molecular Bioscience and Bioengineering. University of Hawaii Haumana Biomedical Research Program.
- Candau, R., D. M. Scolnick, P. Darpino, C. Y. Ying, T. D. Halazonetis, and S. L. Berger. 1997. Two tandem and independent sub-activation domains in the amino terminus of p53 require the adaptor complex for activity. *Oncogene* 15(7): 807-816.
- Carstens, M. J., A. Krempler, A. A. Triplett, M. Van Lohuizen, and K. U. Wagner. 2004. Cell cycle arrest and cell death are controlled by p53-dependent and p53-independent mechanisms in Tsg101-deficient cells. *The Journal of biological chemistry* 279(34): 35984-35994.
- Carstens, R. P., E. J. Wagner, and M. A. Garcia-Blanco. 2000. An intronic splicing silencer causes skipping of the IIIb exon of fibroblast growth factor receptor 2 through involvement of polypyrimidine tract binding protein. *Molecular and cellular biology* 20(19): 7388-7400.
- Cermak, T., E. L. Doyle, M. Christian, L. Wang, Y. Zhang, C. Schmidt, J. A. Baller, N. V. Somia, A. J. Bogdanove, and D. F. Voytas. 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic acids research* 39(12): e82-e82.
- Cha, G. H., W. N. Wang, T. Peng, M. Z. Huang, and Y. Liu. 2015. A Rac1 GTPase is a critical factor in the immune response of shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus* infection. *Developmental and comparative immunology* 51(2): 226-237.
- Chan T. A., P. M. Hwang, H. Hermeking, K. W. Kinzler and B. Vogelstein. 2000. Cooperative effects of genes controlling the G(2)/M checkpoint. *Genes Dev.* 14(3):1584-1588.
- Chang, C. C., M. S. Yeh, and W. Cheng. 2009. Cold shock-induced norepinephrine triggers apoptosis of haemocytes via caspase-3 in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology* 27(6): 695-700.

- Chang, Y. T., C. Y. Lin, C. Y. Tsai, V. S. Siva, C. Y. Chu, H. J. Tsai, and Y. L. Song. 2012. The new face of the old molecules: crustin Pm4 and transglutaminase type I serving as rnpS down-regulate astakine-mediated hematopoiesis. *PLoS one* 8(8): e72793-e72793.
- Chen, Y., W. Lu, N. Gao, Y. Long, Y. Shao, M. Liu, H. Chen *et al.* 2016. Generation of obese rat model by transcription activator-like effector nucleases targeting the leptin receptor gene. *Sci. China Life Sci.* 1-6.
- Chen, Y. C., S. Y. Lin-Shiau, and J. K. Lin. 1999. Involvement of heat-shock protein 70 and P53 proteins in attenuation of UVC-induced apoptosis by thermal stress in hepatocellular carcinoma cells. *Photochemistry and photobiology* 70(1): 78-86.
- Chen, Y. Y., J. C. Chen, Y. C. Lin, S. T. Yeh, and C. L. Huang. 2014. White Shrimp *Litopenaeus vannamei* that have received *Gracilaria tenuistipitata* extract show early recovery of immune parameters after ammonia stressing. *Marine drugs* 13(6): 3606-3624.
- Chorev, M., and L. Carmel. 2012. The function of introns. *Front genet* 3(55): 1-12.
- Claydon, K., and L. Owens. 2008. Attempts at immortalization of crustacean primary cell cultures using human cancer genes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 44(10): 451-457.
- Claydon, K., K. G. Roper, and L. Owens. 2010. Attempts at producing a hybridised *Penaeus monodon* cell line by cellular fusion. *Fish & shellfish immunology* 29(3): 539-543.
- Costa, S., D. Pinto, D. Pereira, H. Rodrigues, J. Cameselle-Teijeiro, R. Medeiros, and F. Schmitt. 2007. Importance of TP53 codon 72 and intron 3 duplication 16bp polymorphisms in prediction of susceptibility on breast cancer. *BMC cancer* 8(1): 1-7.
- Cui, S., B. Wang, Y. Zhao, H. Chen, H. Ding, D. Zhi, and S. Zhang. 2014. Transmembrane routes of cationic liposome-mediated gene delivery using human throat epidermis cancer cells. *Biotechnology letters* 36(1): 1-7.
- Dhar, A. K., D. K. Lakshman, S. Natarajan, F. C. Allnutt, and N. A. van Beek. 2007. Functional characterization of putative promoter elements from infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus (IHHNV) in shrimp and in insect and fish cell lines. *Virus research* 127(1): 1-8.

- Dhar, A. K., R. M. Bowers, K. S. Licon, G. Veazey, and B. Read. 2009. Validation of reference genes for quantitative measurement of immune gene expression in shrimp. *Molecular Immunology* 46(8/9): 1688-1695.
- Do, T. N., E. Ucisik-Akkaya, C. F. Davis, B. A. Morrison, and M. T. Dorak. 2010. An intronic polymorphism of IRF4 gene influences gene transcription in vitro and shows a risk association with childhood acute lymphoblastic leukemia in males. *Biochimica et biophysica acta* 1802(2): 292-300.
- Donehower, L. A., L. A. Godley, C. M. Aldaz, R. Pyle, Y. P. Shi, D. Pinkel, Joe Gray, A. Bradley, D. Medina, and H. E. Varmus. 1995. Deficiency of p53 accelerates mammary tumorigenesis in Wnt-1 transgenic mice and promotes chromosomal instability. *Genes and Development* 9(7): 882-895.
- Dorak, M. T. 2007. *Real-time PCR*. United Kingdom. Taylor & Francis.
- Doudna, J. A., and C. A. Gersbach. 2015. Genome editing: the end of the beginning. *Genome biology* 1(16): 1-3.
- Doyle, E. L., N. J. Booher, D. S. Standage, D. F. Voytas, V. P. Brendel, J. K. VanDyk, and A. J. Bogdanove. 2012. TAL Effector-Nucleotide Targeter (TALE-NT) 2.0: tools for TAL effector design and target prediction. *Nucleic acids research* 40(W1): W117-W122.
- Ebersbach, G., and K. Gerdes. 2005. Plasmid segregation mechanisms. *Annu. Rev. Genet.* 39: 453-479.
- Ebrahimi, R., J. B. Liang, P. Shokryazdan, and Z. Idrus. 2014. Effect of dietary lead on intestinal nutrient transporters mRNA expression in broiler chickens. *BioMed research international* 2015: 149745-149745.
- Falahi, F., A. Sgro, and P. Blancafort. 2015. Epigenome engineering in cancer: fairytale or a realistic path to the clinic?. *Frontiers in oncology*, 5(22): 1-11.
- Fan, Y., T. V. Lee, D. Xu, Z. Chen, A. F. Lamblin, H. Steller, and A. Bergmann. 2010. Dual roles of *Drosophila* p53 in cell death and cell differentiation. *Cell death and differentiation* 17(6): 912-921.
- Farcy, E., C. Fleury, C. Lelong, M. P. Dubos, C. Voiseux, B. Fiévet, and J. M. Lebel. 2008. Molecular cloning of a new member of the p53 family from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* and seasonal pattern of its transcriptional expression level. *Marine environmental research* 66(2): 300-308.

- Farcy, E., C. Voiseux, J. M. Lebel, and B. Fiévet. 2009. Transcriptional expression levels of cell stress marker genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed to acute thermal stress. *Cell stress & chaperones* 14(4): 371-380.
- Farnham, P. J., and A. L. Means. 1990. Sequences downstream of the transcription initiation site modulate the activity of the murine dihydrofolate reductase promoter. *Molecular and cellular biology* 10(4): 1390-1398.
- Flegel, T. W., D. V. Lightner, C. F. Lo, and L. Owens. 2008. Shrimp disease control: past, present and future. *Diseases in Asian Aquaculture VI. Fish Health Section, Asian Fisheries Society*. 355-378.
- Fridman, J. S., and S. W. Lowe. 2003. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22(56): 9030-9040.
- Gao, X., and L. Huang. 1995. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene therapy* 2(10): 710-722.
- George, S. K., and A. K. Dhar. 2010. An improved method of cell culture system from eye stalk, hepatopancreas, muscle, ovary, and hemocytes of *Penaeus vannamei*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 46(9): 801-810.
- George, S. K., K. N. Kaizer, Y. M. Betz, and A. K. Dhar. 2011. Multiplication of Taura syndrome virus in primary hemocyte culture of shrimp (*Penaeus vannamei*). *Journal of virological methods* 172(1): 54-59.
- Gilthorpe, J., M. Vandromme, T. Brend, A. Gutman, D. Summerbell, N. Totty, and P. W. Rigby. 2002. Spatially specific expression of Hoxb4 is dependent on the ubiquitous transcription factor NFY. *Development* 129(16): 3887-3899.
- Godbey, W. T., Kenneth, K. Wu, and A. G. Mikos. 1999. Tracking the intracellular path of poly (ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(9): 5177-5181.
- Goh, A. M., C. R. Coffill, and D. P. Lane. 2011. The role of mutant p53 in human cancer. *The Journal of pathology* 223(2): 116-126.
- Gong, Y., C. Ju, and X. Zhang. 2015. The miR-1000-p53 pathway regulates apoptosis and virus infection in shrimp. *Fish & shellfish immunology* 46(2): 516-522.
- Granja, C. B., O. M. Vidal, G. Parra, and M. Salazar. 2006. Hyperthermia reduces viral load of white spot syndrome virus in *Penaeus vannamei*. *Diseases of aquatic organisms* 68(2): 175-180.

- Gu, Z. T., H. Wang, L. Li, Y. S. Liu, X. B. Deng, S. F. Huo, F. F. Yuan, Z. F. Liu, H. S. Tong, and L. Su. 2014. Heat stress induces apoptosis through transcription-independent p53-mediated mitochondrial pathways in human umbilical vein endothelial cell. *Scientific reports* 4: 4469-4469.
- Guan, J., E. Stavridi, D. B. Leeper, and G. Iliakis. 2002. Effects of hyperthermia on p53 protein expression and activity. *Journal of cellular physiology* 190(3): 365-374.
- Hanzlíková, M., M. Ruponen, E. Galli, A. Raasmaja, V. Aseyev, H. Tenhu, A. Urtti, and M. Yliperttula. 2011. Mechanisms of polyethylenimine-mediated DNA delivery: free carrier helps to overcome the barrier of cell-surface glycosaminoglycans. *The journal of gene medicine* 13(7-8): 402.
- Hastings, M. L., C. M. Wilson, and S. H. Munroe. 2001. A purine-rich intronic element enhances alternative splicing of thyroid hormone receptor mRNA. *Rna* 7(6): 859-874.
- Heidenreich, E., R. Novotny, B. Kneidinger, V. Holzmann, and U. Wintersberger. 2003. Non-homologous end joining as an important mutagenic process in cell cycle-arrested cells. *The EMBO journal* 22(9): 2274-2283.
- Hiruta, C., Y. Ogino, T. Sakuma, K. Toyota, S. Miyagawa, T. Yamamoto, and T. Iguchi. 2014. Targeted gene disruption by use of transcription activator-like effector nuclease (TALEN) in the water flea *Daphnia pulex*. *BMC biotechnology* 14(95): 1-8.
- Hoffman, R. M. 2015. Application of GFP imaging in cancer. *Laboratory Investigation* 95: 432-452.
- Hosoi, S., T. Sakuma, N. Sakamoto, and T. Yamamoto. 2014. Targeted mutagenesis in sea urchin embryos using TALENs. *Development, growth & differentiation* 56(1): 92-97.
- Hoy, M. A. 2013. *Insect molecular genetics: an introduction to principles and applications*. Third edition. United States of America: Academic Press.
- Hou, C. C., and W. X. Yang. 2013. Characterization and expression pattern of p53 during spermatogenesis in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Molecular biology reports* 40(2): 1043-1051.

- Hu, G. B., D. Wang, and J. X. Chen. 2010. Retroviral delivery of simian virus 40 large T antigen gene into primary cultured ovary cells of the penaeid shrimp, *Penaeus chinensis*: indirect evidence of retroviral integration. *Journal of the World Aquaculture Society* 41(1): 137-143.
- Hu, G. B., D. Wang, C. H. Wang, and K. F. Yang. 2008. A novel immortalization vector for the establishment of penaeid shrimp cell lines. *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 44(3-4): 51-56.
- Hu, W., C. Zhang, R. Wu, Y. Sun, A. Levine, and Z. Feng. 2010. Glutaminase 2, a novel p53 target gene regulating energy metabolism and antioxidant function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(16): 7455-7460.
- Huang, H. Y., C. H. Chien, K. H. Jen, and H. D. Huang. 2006. RegRNA: an integrated web server for identifying regulatory RNA motifs and elements. *Nucleic acids research* 34: W429-34.
- Huang, M., Y. Liu, C. Xie, and W. N. Wang. 2015. LvDJ-1 plays an important role in resistance against *Vibrio alginolyticus* in *Litopenaeus vannamei*. *Fish & shellfish immunology* 44(1): 180-186.
- Huang, T., and X. Zhang. 2013. Host defense against DNA virus infection in shrimp is mediated by the siRNA pathway. *European journal of immunology* 43(1): 137-146.
- Hung, L. H., M. Heiner, J. Hui, S. Schreiner, V. Benes, and A. Bindereif. 2008. Diverse roles of hnRNP L in mammalian mRNA processing: a combined microarray and RNAi analysis. *RNA* 14(2): 284-296.
- Hussain, S. P., P. Amstad, P. He, A. Robles, S. Lupold, I. Kaneko, M. Ichimiya et al. 2004. p53-induced up-regulation of MnSOD and GPx but not catalase increases oxidative stress and apoptosis. *Cancer research* 64(7): 2350-2356.
- Hutvagner, G., and M. J. Simard. 2008. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nature reviews Molecular cell biology* 9(1): 22-32.
- Isaka, K., H. Nishi, Y. Sagawa, T. Nakada, Y. Osakabe, H. Serizawa, Y. Ebihara, and M. Takayama. 2003. Establishment of a new human cell line (EN) with TP53 mutation derived from endometrial carcinoma. *Cancer genetics and cytogenetics* 141(1): 20-25.

- Itami, T., M. Maeda, M. Kondo, and Y. Takahashi. 1999. Primary culture of lymphoid organ cells and haemocytes of kuruma shrimp, *Penaeus japonicus*. *Methods in cell science: an official journal of the Society for In Vitro Biology* 21(4): 237-244.
- Jessen-Eller, K., J. A. Kreiling, G. S. Begley, M. E. Steele, C. W. Walker, R. E. Stephens, and C. L. Reinisch. 2002. A new invertebrate member of the p53 gene family is developmentally expressed and responds to polychlorinated biphenyls. *Environmental health perspectives* 110(4): 377-385.
- Jiang, Y. S., Zhan, W. B., Wang, S. B., and Xing, J. 2006. Development of primary shrimp hemocyte cultures of *Penaeus chinensis* to study white spot syndrome virus (WSSV) infection. *Aquaculture*, 253(1), 114-119.
- Jose, S. 2011. *Cell culture systems from penaeus monodon: development and application*. PhD. diss in Environmental Biotechnology, Cohin University of Science and Technology.
- Joung, J. K., and J. D. Sander. 2013. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature reviews Molecular cell biology* 14(1): 49-55.
- Kabat, J. L., S. Barberan-Soler, P. McKenna, H. Clawson, and T. Farrer. 2006. Intronic alternative splicing regulators identified by comparative genomics in nematodes. *PLoS Computational Biology* 2(7): 734-747.
- Kaestner, L., A. Scholz, and P. Lipp. 2015. Conceptual and technical aspects of transfection and gene delivery. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 25(6): 1171-1176.
- Kakoolaki, S., I. Sharifpour, M. Soltani, H. A. Ebrahimzadeh Mousavi, S. Mirzargar, and M. Rostami. 2010. Selected morpho-chemical features of hemocytes in farmed shrimp, *Fenneropenaeus indicus* in Iran. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 9(2): 219-232.
- Kamachi, Y., and H. Kondoh. 1993. Overlapping positive and negative regulatory elements determine lens-specific activity of the delta 1-crystallin enhancer. *Molecular and cellular biology* 13(9): 5206-5215.
- Kamiya, N., A. Jikko, K. Kimata, C. Damsky, K. Shimizu, and H. Watanabe. 2002. Establishment of a novel chondrocytic cell line N1511 derived from p53-null

- mice. *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 17(10): 1832-1842.
- Karp, Gerald. 2011. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. 6th edition. Mexico: McGraw Hill.
- Karunasagar, I., and L. Ababouch. 2012. Shrimp viral diseases, import risk assessment and international trade. *Indian Journal of Virology* 23(2): 141-148.
- Kawahara, A., Y. Hisano, S. Ota, and K. Taimatsu. 2016. Site-Specific Integration of Exogenous Genes Using Genome Editing Technologies in Zebrafish. *International journal of molecular sciences* 17(5): 727.
- Keller, D. M., S. X. Zeng, and H. Lu. 2003. Interaction of p53 with cellular proteins. *Methods in molecular biology* 234: 121-133.
- Kent, W. J., and A. M. Zahler. 2000. Conservation, regulation, synteny, and introns in a large-scale *C. briggsae* – *C. elegans* genomic alignment. *Genome research* 10(8): 1115-1125.
- Khattak, J. Z. K., S. Rauf, Z. Anwar, H. M. Wahedi, and T. Jamil. 2012. Recent Advances in Genetic Engineering-A Review. *Current Research Journal of Biological Sciences* 4(1):82-89.
- Khoury, M. P., and J. C. Bourdon. 2010. The isoforms of the p53 protein. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(3): a000927.
- Kikuchi, A., Y. Aoki, S. Sugaya, T. Serikawa, K. Takakuwa, K. Tanaka, N. Suzuki, and H. Kikuchi. 1999. Development of novel cationic liposomes for efficient gene transfer into peritoneal disseminated tumor. *Human Gene Therapy* 10(6): 947-955.
- Komine, A., M. Abe, T. Saeki, T. Terakawa, C. Uchida, and T. Uchida. 2012. Establishment of adipose-derived mesenchymal stem cell lines from a p53-knockout mouse. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 426(4): 468-474.
- Kruse, J. P., and W. Gu. 2009. Modes of p53 regulation. *Cell* 137(4): 609-622.
- Kumar, S. R., V. P. Ishaq-Ahamed, and M. Sarathi. 2008. Immunological responses of *Penaeus monodon* to DNA vaccine and its efficacy to protect shrimp against white spot syndrome virus (WSSV). *Fish and Shellfish Immunology* 24(4): 467-478.

- Kumlu, M., S. Türkmen, and M. Kumlu. 2010. Thermal tolerance of *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Penaeidae) acclimated to four temperatures. *Journal of Thermal Biology* 35(6): 305-308.
- Kwok, J. B. J., M. Hallupp, C. T. Loy, D. K. Y. Chan, J. Woo, G. D. Mellick, D. D. Buchanan, P.A. Silburn, G. M. Halliday, and P. R. Schofield. 2005. GSK3B polymorphisms alter transcription and splicing in Parkinson's disease. *Annals of neurology* 58(6): 829-839.
- Leebonoi, W., S. Sukthaworn, S. Panyim, and A. Udomkit. 2015. A novel gonad-specific Argonaute 4 serves as a defense against transposons in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish & shellfish immunology* 42(2): 280-288.
- Levine, A. J., and M. Oren. 2009. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature Reviews Cancer* 9(10): 749-758.
- Levrero, M., V. De Laurenzi, A. Costanzo, J. Gong, J. Y. Wang, and G. Melino. 2000. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *Journal of cell science* 113(10): 1661-1670.
- Li, B., J. A. Xian, H. Guo, A. L. Wang, Y. T. Miao, J. M. Ye, C. X. Ye, and S. A. Liao. 2014. Effect of temperature decrease on hemocyte apoptosis of the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture international* 22(2): 761-774.
- Li, G., J. H. Bahn, J. H. Lee, G. Peng, Z. Chen, S. F. Nelson, and X. Xiao. 2012. Identification of allele-specific alternative mRNA processing via transcriptome sequencing. *Nucleic acids research* 40(13): e104.
- Li, C. Y., H. Y. Yan, and Y. L. Song. 2010. Tiger shrimp (*Penaeus monodon*) penaeidin possesses cytokine features to promote integrin-mediated granulocyte and semi-granulocyte adhesion. *Fish & shellfish immunology* 28(1): 1-9.
- Li, S. S., and H. J. Tsai. 2000. Transfer of foreign gene to giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) by spermatophore-microinjection. *Molecular reproduction and development* 56(2): 149-154.
- Liu, Y., L. Song, Y. Sun, T. Liu, F. Hou, and X. Liu. 2016. Comparison of immune response in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after knock down

- of Toll and IMD gene in vivo. *Developmental & Comparative Immunology* 60: 41-52.
- Liu, Z., J. Xiang, G. Zhou, and Z. Gong. 2001. Foreign gene transfer into Chinese shrimps (*Penaeus chinensis*) with gene gun. *Chinese Science Bulletin* 46(9): 766-770.
- Loayza-Puch, F., J. Drost, K. Rooijers, R. Lopes, R. Elkon, and R. Agami. 2013. p53 induces transcriptional and translational programs to suppress cell proliferation and growth. *Genome Biol* 14(4): 1-12.
- Long, Y., L. Li, Q. Li, X. He, and Z. Cui. 2012. Transcriptomic characterization of temperature stress responses in larval zebrafish. *PloS one* 7(5): e37209.
- Lu, W. J., and J. M. Abrams. 2006. Lessons from p53 in non-mammalian models. *Cell death and differentiation* 13(6): 909-912.
- Ma, L., W. R. Jeffery, J. J. Essner, and J. E. Kowalko. 2015. Genome editing using TALENs in blind Mexican cavefish, *Astyanax mexicanus*. *PloS one* 10(3): e0119370.
- Madeira, D., L. Narciso, H. N. Cabral, C. Vinagre, and M. S. Diniz. 2013. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 166(2): 237-243.
- Majewski, J., and J. Ott. 2002. Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome. *Genome research* 12(12): 1827-1836.
- Martinez-Contreras R., P. Cloutier, L. Shkreta, J. F. Fiset, T. Revil, and B. Chabot. 2008. hnRNP proteins and splicing control. *Advances in Experimental Medicine & Biology*. Ed. Blencowe B. J., and B. R. Graveley. 123-147. New York, USA: Landes Bioscience and Springer Science+Business Media,LLC.
- Mathiesen, A. M. 2012. *The State of the World Fisheries and Aquaculture*. 2012. Roma.
- Matoba, S., J. G. Kang, W. D. Patino, A. Wragg, M. Boehm, O. Gavrilova, P. J. Hurley, F. Bunz, and P. M. Hwang. 2006. p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312(5780): 1650-1653.

- Matozzo, V., and M. G. Marin. 2010. First cytochemical study of haemocytes from the crab *Carcinus aestuarii* (Crustacea, Decapoda). *European Journal of Histochemistry* 54(1): 44-49.
- McKinney, K., M. Mattia, V. Gottifredi, and C. Prives. 2004. p53 linear diffusion along DNA requires its C terminus. *Molecular cell* 16(3): 413-424.
- Medina-Kauwe L. K., J. Xie, and S. Hamm-Alvarez. 2005. Intracellular trafficking of nonviral vectors. *Gene Ther.* 12(24): 1734-51.
- Mehier-Humbert, S., and R. H. Guy. 2005. Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Advanced drug delivery reviews* 57(5): 733-753.
- Mendoza, D. 2011. *Panorama de la Acuicultura Mundial, en América Latina y el Caribe y en el Perú*. Lima. Perú.
- Millar, D. S., M. Horan, N. A. Chuzhanova, and D. N. Cooper. 2010. Characterization of a functional intronic polymorphism in the human growth hormone (GHI) gene. *Human genomics* 4(5): 289-301.
- Miller, J. C., S. Tan, G. Qiao, K. A. Barlow, J. Wang, D. F. Xia, X. Meng *et al.* 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature biotechnology* 29(2): 143-148.
- Moghaddassi, S., W. Eyestone, and C. E. Bishop. 2014. TALEN-mediated modification of the bovine genome for large-scale production of human serum albumin. *PloS one* 9(2): e89631.
- Momand, J., H. H. Wu, and G. Dasgupta. 2000. MDM2-master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene* 242(1): 15-29.
- Moore, R., A. Chandrabhas, and L. Bleris. 2014. Transcription activator-like effectors: a toolkit for synthetic biology. *ACS synthetic biology* 3(10): 708-716.
- Morten, B. C., M. W. Wong-Brown, R. J. Scott, and K. A. Avery-Kiejda. 2016. The presence of the intron 3 16 bp duplication polymorphism of p53 (rs17878362) in breast cancer is associated with a low $\Delta 40p53$: p53 ratio and better outcome. *Carcinogenesis* 37(1): 81-86.
- Moser, S. C., S. von Elsner, I. Büssing, A. Alpi, R. Schnabel, and A. Gartner. 2009. Functional dissection of *Caenorhabditis elegans* CLK-2/TEL2 cell cycle

- defects during embryogenesis and germline development. *PLoS Genet* 5(4): e1000451.
- Naitou, A., Y. Kato, T. Nakanishi, T. Matsuura, and H. Watanabe. 2014. Heterodimeric TALENs induce targeted heritable mutations in the crustacean *Daphnia magna*. *Biology open* 4(3): 364-369.
- Nakamura, A. M., S. Chahad-Ehlers, A. L. A. Lima, C. H. Taniguti, I. Sobrinho Jr, F. R. Torres, and R. A. de Brito. 2016. Reference genes for accessing differential expression among developmental stages and analysis of differential expression of OBP genes in *Anastrepha obliqua*. *Scientific reports* 28(6):17480
- Nill, K. 2005. *Glossary of biotechnology terms*. Third edition. Florida, USA: CRC press.
- Nilsen, T. W. 2003. The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell?. *Bioessays* 25(12): 1147-1149.
- Nitta, M., H. Okamura, S. Aizawa, and M. Yamaizumi. 1997. Heat shock induces transient p53-dependent cell cycle arrest at G1/S. *Oncogene* 15(5): 561-568.
- Olivier, M., D. E. Goldgar, N. Sodha, H. Ohgaki, P. Kleihues, P. Hainaut, and R. A. Eeles. 2003. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer research* 63(20): 6643-6650.
- Ollmann, M., L. M. Young, C. J. Di Como, F. Karim, M. Belvin, S. Robertson, K. Whittaker *et al.* *Drosophila* p53 is a structural and functional homolog of the tumor suppressor p53. *Cell* 101(1): 91-101.
- Ometto, L., W. Stephan, and D. De Lorenzo. 2005. Insertion/deletion and nucleotide polymorphism data reveal constraints in *Drosophila melanogaster* introns and intergenic regions. *Genetics* 169(3): 1521-1527.
- Ou, H. D., F. Löhr, V. Vogel, W. Mäntele, and V. Dötsch. 2007. Structural evolution of C-terminal domains in the p53 family. *The EMBO journal* 26(14): 3463-3473.
- Parsch, J. 2003. Selective constraints on intron evolution in *Drosophila*. *Genetics* 165(4): 1843-1851.

- Perry, M. E. 2010. The regulation of the p53-mediated stress response by MDM2 and MDM4. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(1): a000968.
- Petitjean, A., E. Mathe, S. Kato, C. Ishioka, S. V. Tavtigian, P. Hainaut, and M. Olivier. 2007. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Human mutation* 28(6): 622-629.
- Pfeiffer, P. 1998. The mutagenic potential of DNA double-strand break repair. *Toxicology letters* 96: 119-129.
- Piasecka, A., P. Brzuzan, M. Woźny, S. Ciesielski, and D. Kaczmarczyk. 2015. Splice-acceptor site mutation in p53 gene of hu888 zebrafish line. *Journal of applied genetics* 56(1): 115-121.
- Pichon, C., L. Billiet, and P. Midoux. 2010. Chemical vectors for gene delivery: uptake and intracellular trafficking. *Current opinion in biotechnology* 21(5): 640-645.
- Prapavorarat, A., T. Vatanavicharn, K. Söderhäll, and A. Tassanakajon. 2010. A novel viral responsive protein is involved in hemocyte homeostasis in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Journal of Biological Chemistry* 285(28): 21467-21477.
- Priami, C., G. De Michele, F. Cotelli, A. Cellerino, M. Giorgio, P. Giuseppe Pelicci, and E. Migliaccio. 2015. Modelling the p53/p66Shc aging pathway in the shortest living vertebrate *Nothobranchius furzeri*. *Aging and disease* 6(2): 95-108.
- Prykhozhiy, S. V. 2010. In the absence of Sonic hedgehog, p53 induces apoptosis and inhibits retinal cell proliferation, cell-cycle exit and differentiation in zebrafish. *PLoS One* 5(10): e13549.
- Qian, Z., T. Liu, Q. Liu, S. He, Y. Liu, F. Hou, X. Wang, X. Mi, C. Cai, and X. Liu. 2014. p53 is involved in shrimp survival via its regulation roles on MnSOD and GPx in response to acute environmental stresses. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 159: 38-51.
- Qian, Z., X. Liu, L. Wang, X. Wang, Y. Li, J. Xiang, and P. Wang. 2012. Gene expression profiles of four heat shock proteins in response to different acute

- stresses in shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 156(3): 211-220.
- Qiu, J., W. N. Wang, L. J. Wang, Y. F. Liu, and A. L. Wang. 2011. Oxidative stress, DNA damage and osmolality in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* exposed to acute low temperature stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 154(1): 36-41.
- Rahman, M. M., C. M. Escobedo-Bonilla, M. Corteel, J. J. Dantas-Lima, M. Wille, V. A. Sanz, M. B. Pensaert, P. Sorgeloos, and H. J. Nauwynck. 2006. Effect of high water temperature (33 °C) on the clinical and virological outcome of experimental infections with white spot syndrome virus (WSSV) in specific pathogen-free (SPF) *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 261(3): 842-849.
- Reese, M. G., F. H. Eeckman, D. Kulp, and D. Haussler. 1997. Improved splice site detection in Genie. *Journal of computational biology* 4(3): 311-323.
- Rendón, L., y J. L. Balcázar. 2003. Inmunología de camarones: Conceptos básicos y recientes avances. *Revista AquaTIC* 19: 27-33.
- Rout, N., S. Kumar, S. Jaganmohan, and V. Murugan. 2007. DNA vaccines encoding viral envelope proteins confer protective immunity against WSSV in black tiger shrimp. *Vaccine* 25(15): 2778-2786.
- Rutkowski, R., K. Hofmann, and A. Gartner. 2010. Phylogeny and function of the invertebrate p53 superfamily. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(7): a001131.
- Sadeghi, R. N., N. Sahba, M. Vahedi, and S. R. Mohebbi. 2013. Association of intron and exon polymorphisms of p53 gene in Iranian patients with gastritis. *Gastroenterology and Hepatology from bed to bench* 6(1): S45.
- Sailaja, K., V. R. Rao, S. Yadav, R. Rajasekhar Reddy, D. Surekha, D. Nageswara Rao, D. Raghunadharao, and S. Vishnupriya. 2012. Intronic SNPs of TP53 gene in chronic myeloid leukemia: Impact on drug response. *Journal of natural science, biology, and medicine* 3(2): 182-185.
- Sajwan, S., Y. Takasu, T. Tamura, K. Uchino, H. Sezutsu, and M. Zurovec. 2013. Efficient disruption of endogenous *Bombyx* gene by TAL effector nucleases. *Insect biochemistry and molecular biology* 43(1): 17-23.

- Sawicka, K., M. Bushell, K. A. Spriggs and A. E. Willis. 2008. Polypyrimidine-tract-binding protein: a multifunctional RNA-binding protein. *Biochem Soc Trans.* 36(Pt 4): 641-647.
- Schmidt-Nielsen, K. 2000. *Fisiologia Animal: Adaptação E Meio Ambiente*. 5ta edición. Brasil: Grupo Gen-Livraria Santos Editora Ltda.,.
- Schmittgen, T. D., and K. J. Livak. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature protocols* 3(6): 1101-1108.
- Shaw, P. H. 1996. The role of p53 in cell cycle regulation. *Pathology-Research and Practice* 192(7): 669-675.
- Shen, Z., L. Chen, F. Hao, G. Wang, P. Fan, and Y. Liu. 2010. Intron-1 rs3761548 is related to the defective transcription of Foxp3 in psoriasis through abrogating E47/c-Myb binding. *Journal of cellular and molecular medicine* 14(1-2): 226-241.
- Shi, H., T. Tao, D. Huang, Z. Ou, J. Chen, and J. Peng. 2015. A naturally occurring 4-bp deletion in the intron 4 of p53 creates a spectrum of novel p53 isoforms with anti-apoptosis function. *Nucleic acids research* 43(2): 1035-1043.
- Shibata, A., M. Hattori, H. Suda, and Y. Sakaki. 1996. Identification of cis-acting elements involved in an alternative splicing of the amyloid precursor protein (APP) gene. *Gene* 175(1): 203-208.
- Singh, M., A. Yadav, X. Ma, and E. Amoah. 2010. Plasmid DNA transformation in *Escherichia Coli*: effect of heat shock temperature, duration, and cold incubation of CaCl₂ treated cells. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry* 6(4): 561-568.
- Sirand-Pugnet, P., P. Durosay, E. Brody, and J. Marie. 1995. An intronic (A/U) GGG repeat enhances the splicing of an alternative intron of the chicken β -tropomyosin pre-mRNA. *Nucleic acids research* 23(17): 3501-3507.
- Soller, M., and K. White. 2003. ELAV inhibits 3'-end processing to promote neural splicing of ewg pre-mRNA. *Genes & development* 17(20): 2526-2538.
- Soussi, T., and P. May. 1996. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution: a second look. *Journal of molecular biology* 260(5): 623-637.

- Storer, N. Y., and L. I. Zon. 2010. Zebrafish models of p53 functions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2(8): a001123.
- Suman, S., D. Khaitan, U. Pati, R. K. Seth, and S. Chandna. 2009. Stress response of a p53 homologue in the radioresistant Sf9 insect cells. *International journal of radiation biology* 85(3): 238-249.
- Sun, P. S., N. C. Venzon, F. R. O. Calderon, and D. M. Esaki. 2005. Evaluation of methods for DNA delivery into shrimp zygotes of *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture* 243(1): 19-26.
- Sun, Q. Y., L. W. Ding, L. L. He, Y.B. Sun, J. L. Shao, M. Luo, and Z. F. Xu. 2009. Culture of *Escherichia coli* in SOC medium improves the cloning efficiency of toxic protein genes. *Analytical biochemistry* 394(1): 144-146.
- Sung, H. H., and R. Sun. 2002. Use of monoclonal antibodies to classify hemocyte subpopulations of tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Journal of Crustacean Biology* 22(2): 337-344.
- Surget, S., M. P. Khoury, and J. C. Bourdon. 2013. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *OncoTargets and therapy* 7: 57-68.
- Takahashi, T., D. D'Amico, I. Chiba, D. L. Buchhagen, and J. D. Minna. 1990. Identification of intronic point mutations as an alternative mechanism for p53 inactivation in lung cancer. *Journal of Clinical Investigation* 86(1): 363-369.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution* 28(10): 2731-2739.
- Tapay, L. M., Y. Lu, J. A. Brock, E. C. B. Nadala, and P. C. Loh. 1995. Transformation of primary cultures of shrimp (*Penaeus stylirostris*) lymphoid (Oka) organ with simian virus-40 (T) antigen. *Experimental Biology and Medicine* 209(1): 73-78.
- Tassanakajon, A., K. Somboonwiwat, P. Supungul, and S. Tang. 2013. Discovery of immune molecules and their crucial functions in shrimp immunity. *Fish & shellfish immunology* 34(4): 954-967.

- Thongsuksai, P., P. Boonyaphiphat, P. Puttawibul, and W. Sudhikaran. 2010. Specific intronic p53 mutation in esophageal squamous cell carcinoma in Southern Thailand. *World journal of gastroenterology: WJG* 16(42): 5359.
- Tiscornia, G., and M. S. Mahadevan. 2000. Myotonic dystrophy: the role of the CUG triplet repeats in splicing of a novel DMPK exon and altered cytoplasmic DMPK mRNA isoform ratios. *Molecular cell* 5(6): 959-967.
- Tomalty, K. M. H., M. H. Meek, M. R. Stephens, G. Rincón, N. A. Fangué, B. P. May, and M. R. Baerwald. 2015. Transcriptional response to acute thermal exposure in Juvenile Chinook Salmon determined by RNAseq. *G3: Genes Genomes Genetics* 5(7): 1335-1349.
- Toor, N., K. S. Keating, S.D. Taylor, and A. M. Pyle. 2008. Crystal structure of a self-spliced group II intron. *Science* 320(5872): 77-82.
- Trejo-Becerril, C., R. González, M. M. Abad, N. Ichaso, R. Delgado, J. J. Cruz, and A. Dueñas-González. 2000. Immunohistochemical expression of p53 in breast carcinoma is associated with the intron 1 BglII polymorphism of the p53 gene. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 452(2): 231-236.
- Tseng, F. S., H. J. Tsai, I. C. Liao, and Y. L. Song. 2000. Introducing foreign DNA into tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by electroporation. *Theriogenology* 54(9): 1421-1432.
- Tu, Z., G. He, K. X. Li, M. J. Chen, J. Chang, L. Chen, Q. Yao et al. 2005. An improved system for competent cell preparation and high efficiency plasmid transformation using different *Escherichia coli* strains. *Electronic Journal of Biotechnology* 8(1): 113-120.
- Uhde-Stone, C., N. Gor, T. Chin, J. Huang, and B. Lu. 2013. A do-it-yourself protocol for simple transcription activator-like effector assembly. *Biological procedures online* 15(1): 1-8
- Ule, J., G. Stefani, A. Mele, M. Ruggiu, X. Wang, B. Taneri, T. Gaasterland, B. J. Blencowe, and R. B. Darnell. 2006. An RNA map predicting Nova-dependent splicing regulation. *Nature* 444(7119): 580-586.
- Unger, T., J. A. Mietz, M. Scheffner, C. L. Yee, and P. M. Howley. 1993. Functional domains of wild-type and mutant p53 proteins involved in

- transcriptional regulation, transdominant inhibition, and transformation suppression. *Molecular and cellular biology* 13(9): 5186-5194.
- Van de Braak, C. B. T., M. H. A. Botterblom, W. Liu, N. Taverne, W. P. W. Van der Knaap, and J. H. W. M. Rombout. 2002. The role of the haematopoietic tissue in haemocyte production and maturation in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish & shellfish immunology* 12(3): 253-272.
- Vargas-Albores, F., M. A. Guzmán, and J. L. Ochoa. 1993. An anticoagulant solution for haemolymph collection and prophenoloxidase studies of penaeid shrimp (*Penaeus californiensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 106(2): 299-303.
- Vicens, Q., P. J. Paukstelis, E. Westhof, A. M. Lambowitz, and T. R. Cech. 2008. Toward predicting self-splicing and protein-facilitated splicing of group I introns. *Rna* 14(10): 2013-2029.
- Vidal, O. M., C. B. Granja, F. Aranguren, J. A. Brock, and M. Salazar. 2001. A profound effect of hyperthermia on survival of *Litopenaeus vannamei* juveniles infected with white spot syndrome virus. *Journal of the world aquaculture society* 32(4): 364-372.
- Vousden, K. H., and X. Lu. 2002. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer* 2(8): 594-604.
- Wagner, E. J., A. P. Baraniak, O. M. Sessions, D. Mauger, E. Moskowitz, and M. A. Garcia-Blanco. 2005. Characterization of the intronic splicing silencers flanking FGFR2 exon IIIb. *Journal of Biological Chemistry* 280(14): 14017-14027.
- Walker, C. W., B. Low, and S. A. Böttger. 2012. Mortalin in invertebrates and the induction of apoptosis by wild-type p53 following defeat of mortalin-based cytoplasmic sequestration in cancerous clam hemocytes. *In Mortalin Biology: Life, Stress and Death*. Sunil C. K., and R. Wadhwa. 97-113. Netherlands: Springer.
- Walker, C., S. A. Böttger, J. Mulkern, E. Jerszyk, M. Litvaitis, and M. Lesser. 2009. Mass culture and characterization of tumor cells from a naturally occurring invertebrate cancer model: applications for human and animal disease and environmental health. *The Biological Bulletin* 216(1): 23-39.

- Wang, Z., X. Xiao, E. Van Nostrand, and C. B. Burge. 2006. General and specific functions of exonic splicing silencers in splicing control. *Molecular cell* 23(1): 61-70.
- Wang-Gohrke, S., H. Becher, R. Kreienberg, I. B. Runnebaum, and J. Chang-Claude. 2002. Intron 3 16 bp duplication polymorphism of p53 is associated with an increased risk for breast cancer by the age of 50 years. *Pharmacogenetics and Genomics* 12(3): 269-272.
- Warf, M. B., and J. A. Berglund. 2007. MBNL binds similar RNA structures in the CUG repeats of myotonic dystrophy and its pre-mRNA substrate cardiac troponin T. *Rna* 13(12): 2238-2251.
- Warmerdam, D. O., and R. Kanaar. 2010. Dealing with DNA damage: relationships between checkpoint and repair pathways. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 704(1): 2-11.
- Wei, P., X. Jin, X. S. Zhang, Z. Y. Hu, C. S. Han, and Y. X. Liu. 2005. Expression of Bcl-2 and p53 at the fetal-maternal interface of rhesus monkey. *Reproductive Biology and Endocrinology* 3(1): 1-10.
- Will, C. L., and R. Lührmann. 2011. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3(7): a003707.
- Wolkowicz, R., and V. Rotter. 1997. The DNA binding regulatory domain of p53: see the C. *Pathologie-biologie* 45(10): 785-796.
- Wu, C. P., L. Zhou, M. Xie, H. D. Du, J. Tian, S. Sun, and J. Y. Li. 2013. Identification of cancer stem-like side population cells in purified primary cultured human laryngeal squamous cell carcinoma epithelia. *PLoS one* 8(6): e65750.
- Xia, W., P. Bringmann, J. McClary, P. P. Jones, W. Manzana, Y. Zhu, S. Wang et al. 2006. High levels of protein expression using different mammalian CMV promoters in several cell lines. *Protein expression and purification* 45(1): 115-124.
- Xiao, A., Z. Wang, Y. Hu, Y. Wu, Z. Luo, Z. Yang, Y. Zu et al. 2013. Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENs and CRISPR/Cas in zebrafish. *Nucleic acids research* 41(14): e141-e141.
- Yang, J. P., and L. Huang. 1998. Time-dependent maturation of cationic liposome-DNA complex for serum resistance. *Gene therapy* 5(3): 380-387.

- Yao, C. L., and G. N. Somero. 2013. Thermal stress and cellular signaling processes in hemocytes of native (*Mytilus californianus*) and invasive (*M. galloprovincialis*) mussels: cell cycle regulation and DNA repair. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 165(2): 159-168.
- Yazawa, R., K. Watanabe, T. Koyama, L. Ruangapan, A. Tassanakajon, I. Hirono, and T. Aoki. 2005. Development of gene transfer technology for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology* 303(12): 1104-1109.
- Zakut-Houri, R., M. Oren, B. Bienz, V. Lavie, S. Hazum, and D. Givol. 1983. A single gene and a pseudogene for the cellular tumour antigen p53. *Nature* 306(5943): 594-597.
- Zhang, Y., F. Zhang, X. Li, J. A. Baller, Y. Qi, C. G. Starker, A. J. Bogdanove, and D. F. Voytas. 2013. Transcription activator-like effector nucleases enable efficient plant genome engineering. *Plant physiology* 161(1): 20-27.
- Zhou, J., L. Wang, Y. Xin, W. N. Wang, W. Y. He, A. L. Wang, and Y. Liu. 2010. Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Thermal Biology* 35(6): 284-289.
- Zhou, M., A. L. Wang, and J. A. Xian. 2011. Variation of free amino acid and carbohydrate concentrations in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: effects of continuous cold stress. *Aquaculture* 317(1): 182-186.
- Zhu M. and C. Yao. 2015. The impact of temperature stress on the oxygen metabolism and energy metabolism in the hepatopancreas of shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Journal of Fisheries of China* 39(5): 669-678.

Dedico esta investigación a
mi familia que es el motor
que me permite seguir
adelante ante cualquier
dificultad en mi vida y todo
proyecto que realice.

AGRADECIMIENTOS

Debo agradecer a Dios, mi padre Máximo Salvatierra, mi madre Lucía Alor y mi hermana Cynthia Salvatierra por haberme dado la oportunidad de desarrollarme académicamente y ser una gran motivación para todas las cosas que he realizado en esta vida y aquellos proyectos que realizaré, muchas gracias.

Mi agradecimiento también va dirigido a mi asesor de tesis, el PhD. Emmerik Motte por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad, conocimiento científico y motivación así como por haberme guiado durante todo el desarrollo de la tesis.

Además agradezco al PhD. Eric Mialhe y la PhD. Virna Cdeño, así como a todo el equipo de investigación de Inca'Biotec por haber sido parte del grupo de profesores y guías en este período de mi vida para capacitarme en la biotecnología molecular y poder realizar este proyecto de investigación.

Estoy muy agradecido a Savina A. Gutierrez por haberme acompañado en este camino y ser siempre un apoyo científico y emocional para superar muchos obstáculos que se presentaron y perseverar en todo momento. Muchas gracias.

Agradezco también al equipo de ingeniería genética conformada por Vania Cedrón, Joel Zegarra, Yacory Sernaqué y Doris Villanueva ya que gracias a su esfuerzo, dedicación y aporte científico se pudo desarrollar este trabajo.

Quiero agradecer al equipo de técnicos: Petter Baca, César Chanta, Pedro Ramirez y Rodrigo Chota, amigos maestrantes y tesistas con los que trabajamos en Incabiotec, que pudieron colaborar con el proyecto en distintos aspectos.

Agradezco a la Universidad Nacional de Tumbes y los coordinadores Auberto Hidalgo y Eneida Vieira por la creación de este programa de maestría. De igual forma agradecer a la empresa Incabiotec S.A.C. su equipo directivo y

administrativo por haberme apoyado permitiendo el uso de la infraestructura, equipos y reactivos para el desarrollo del proyecto de tesis.

Un agradecimiento especial a la institución CONCYTEC por la ejecución de programas de subvención para maestrías nacionales, sin lo cual hubiera sido muy difícil seguir esta maestría de Biotecnología Molecular y que además incentiva a realizar la investigación en nuestro país.

Quiero agradecer también a la langostinera La Fragata S.A. por haber facilitado gustosamente la obtención de la muestra biológica para el desarrollo de este proyecto.

Para finalizar, también agradezco a todos mis compañeros de clase durante los dos años de la maestría, ya que gracias a la amistad y esfuerzo conjunto hemos logrado la culminación exitosa de este período de estudios.