

EXPRESION DEL GEN QUE CODIFICA UN INHIBIDOR DE PROTEASAS TIPO KAZAL EN *Litopenaeus vannamei*: ESTUDIO BAJO CONDICIONES DE AYUNO

Juana Meliza Gutiérrez-Ayala y Claudio Humberto Mejía-Ruiz. CIBNOR. Mar Bermejo 195, Col. Playa Palo, Santa Rita, La Paz, B.C.S. Mex. Fax, (112) 53625. hmejia@cibnor.mx

Palabras clave: *Inhibidor tipo Kazal, Litopenaeus vannamei, RT-PCR*

Introducción. Los inhibidores tipo Kazal están ampliamente distribuidos en los animales superiores. Sin embargo, en invertebrados solo se ha descrito uno en el camarón de río *Pascifastacus leniusculus* (Johansson et al 1994) y recientemente en *Toxoplasma gondii* (Pszenny 2000). Como la gran mayoría de inhibidores de proteasas su importancia radica en aplicaciones medicas.

El objetivo central del trabajo es identificar mecanismos de regulación molecular en el hepatopáncreas del camarón.

Metodología. Camarones juveniles de *L. vannamei* fueron utilizados para el bioensayo. En cada una de 4 tanques de 200 litros se colocaron 5 camarones los cuales se alimentaron y aclimataron por 1 día. Los lotes B, C, y D de camarones fueron sometidos a diferentes periodos de ayuno, de la siguiente manera: 24, 48 y 72 horas respectivamente y un control (Tanque A) que no dejo de proporcionársele alimento. Terminado el tratamiento, el hepatopáncreas de cada camarón se extirpó para extraer RNA total, del cual se realizaron reacciones de RT-PCR y PCR con primers degenerados previamente diseñados a partir de secuencias aminoácidos de inhibidores tipo Kazal.

Resultados y Discusión. No se presentó mortandad en ninguno de los tratamientos. La figura 1 muestra los productos de amplificación por RT-PCR a partir de los RNAs obtenidos de hepatopáncreas de los 5 individuos en cada uno de los diferentes periodos de ayuno.

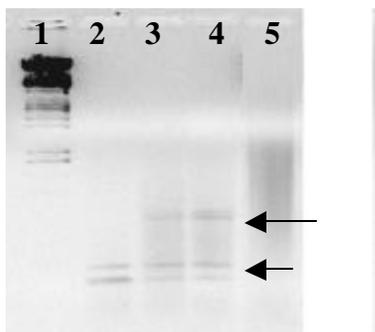


Fig. 1. Electrolisis de gel de agarosa de los productos de amplificación por RT-PCR en diferentes condiciones de ayuno. Carriles 2, 3 y 4 camarones alimentados a diferentes tiempos, carril 5 camarón no alimentado. Carril 1: Marcador de pesos moleculares.

Las bandas (de 85 y 110 pb) de los carriles 2, 3 y 4 indican al parecer, diferentes isoformas de la expresión del mismo gen. Las bandas extras (de 250y 260 pb) de los carriles 3 y 4 sugieren que el gen se expresa desde otra isoforma. El carril 5 por su parte, indica que el ayuno de tres días al que se sometieron los organismos no indujo la expresión del gen *LvKPI*.

La figura 2 muestra la alineación de la secuencia deducida a partir del producto de PCR secuenciado, comparado contra la secuencia reportada del inhibidor de proteasas descrito en *Pascifastacus leniusculus*

```
QQYDPVCGTDG   Plkazinh.PRO
::YDPVC  :::
RRYDPVCRSNA   KPI.PRO
```

Fig. 2. Alineación de Proteínas tipo Lipman-Pearson

Conclusiones. Las amplificaciones obtenidas a partir de los RNAs extraídos de los camarones tratados en el bioensayo mediante diferentes condiciones de ayuno, sugieren fuertemente que el RNAm de *KPI* es expresado a tiempos diferentes en mas de una isoforma, lo cual es influenciado indirectamente por la presencia de alimento. El análisis de la secuencia obtenida a partir del aislamiento de una de las bandas sugiere fuertemente que se trata de un inhibidor tipo Kazal con alta similitud al reportado por Johansson y col., (1994) en *P. leniusculus*. La alineación de la secuencia de aminoácidos deducida de *KPI*, sugiere que debe existir una estrecha relación entre ambos péptidos (45.5%).

Agradecimiento. Este trabajo fue financiado por el proyecto SIMAC 980106079. Los camarones fueron donados por el Laboratorio de Estanquería de Supralitoral del CIBNOR.

Bibliografía.

- Johansson, MW, Keyser P. and K. Söderhäll. (1994). Purification and cDNA cloning of a four-domain Kazal proteinase inhibitor from crayfish blood cells. Eur. J. Biochem. 223(2):389-94.
- Pszenny V, Angel S, Duschak V, Paulino M, Ledesma B, Yabo M, Guarnera E, Ruiz. AM, Bontempi E. 2000. Molecular cloning, sequencing and expression of a serine proteinase inhibitor gene from *Toxoplasma gondii*. Mol Biochem Parasitol. 15;107(2):241-9