

ENTPDASAS: ENZIMAS QUE REGULAN LA SEÑALIZACIÓN EXTRACELULAR DE ATP, ADP Y ADENOSINA EN LA RETINA DE VERTEBRADOS. PARTE 1:PEZ CEBRA.

Ricatti, M. Jimena; Alfie, Lionel D;
Schwarzbaum, Pablo J; Faillace, M. Paula.

Cita:

Ricatti, M. Jimena; Alfie, Lionel D; Schwarzbaum, Pablo J; Faillace, M. Paula. (Noviembre, 2006). *ENTPDASAS: ENZIMAS QUE REGULAN LA SEÑALIZACIÓN EXTRACELULAR DE ATP, ADP Y ADENOSINA EN LA RETINA DE VERTEBRADOS. PARTE 1:PEZ CEBRA. XXI REUNIÓN ANUAL SAN. Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias, Los Cocos, Pcia de Córdoba.*

Dirección estable: <https://www.aacademica.org/lionel.david.alfie/10>

ARK: <https://n2t.net/ark:/13683/pux8/S7K>



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons.
Para ver una copia de esta licencia, visite
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>.

Acta Académica es un proyecto académico sin fines de lucro enmarcado en la iniciativa de acceso abierto. Acta Académica fue creado para facilitar a investigadores de todo el mundo el compartir su producción académica. Para crear un perfil gratuitamente o acceder a otros trabajos visite: <https://www.aacademica.org>.

ENTPDASAS: ENZIMAS QUE REGULAN LA CONCENTRACIÓN EXTRACELULAR DE ATP, ADP Y ADENOSINA EN RETINA DE VERTEBRADOS. PARTE I: PEZ CEBRA

M. JIMENA RICATTI¹, LIONEL D. ALFIE¹, PABLO J. SCHWARZBAUM², M. PAULA FAILLACE^{1,2}.

1. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA. 2. IQUIFIB, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Buenos Aires, Argentina.
e-mail: pfallace@qb.fyb.uba.ar

INTRODUCCIÓN

El ATP es liberado por neuronas y células de la glia, actuando como un neurotransmisor y neuromodulador vía receptores purinérgicos P2. Las concentraciones de ATP extracelular son precisamente reguladas por glicoproteínas de membrana llamadas ecto-nucleósido trifosfato difosfohidrolasas (ENTPDasas). Estas enzimas hidrolizan nucleósidos tri y difosfato. El AMP resultante es metabolizado también extracelularmente a adenosina por una ecto-5'-nucleotidasa. La adenosina, por su parte, ha sido descrita como un potente neuromodulador inhibitorio uniéndose a receptores purinérgicos P1. La actividad de las ENTPDasas puede ser definida por su dependencia de Ca²⁺ y Mg²⁺ y su falta de sensibilidad a los inhibidores de las ATPasas y fosfatasa. Las ENTPDasas cumplen dos funciones: 1) terminan la señalización vía receptores P2 por remoción del ATP y ADP extracelular y 2) generan adenosina extracelular induciendo señalización vía receptores P1. Varios subtipos de ENTPDasas se caracterizaron en vertebrados mediante el clonado de sus secuencias codificantes. Entre las más importantes, la ENTPDasa 1 exhibe una actividad ADPasa varias veces mayor a la del subtipo 2, produciendo mucho más AMP.

OBJETIVO

1) Describir la presencia de actividad ENTPDasa. 2) Caracterizar la localización de ENTPDasas 1 y 2 en las capas retinianas de pez cebra.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Se utilizaron retinas de pez cebra (*Danio rerio*).

Actividad en homogenatos de membranas: Se determinó actividad Ecto-ATPasa en presencia de ATP y [³²P]-ATP. La reacción fue detenida a distintos tiempos por transferencia de alícuotas a una solución de ácido perclórico y molibdato de amonio. El fosfato liberado forma un complejo fofomolibdico que se extrae con isobutanol. Se cuantificó la radiactividad de esta fase.

Western blot: la expresión de proteínas ENTPDasas fue detectada con anticuerpos primarios y secundarios acoplados a peroxidasa y un sustrato quimioluminiscente.

Inmunohistoquímica: los ojos fueron fijados con paraformaldehído y cortados en crióstato en secciones de 10 µm. Se incubaron con anticuerpos primarios contra las ENTPDasas y/o marcadores de células retinianas. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con Cy3 o FITC.

RESULTADOS

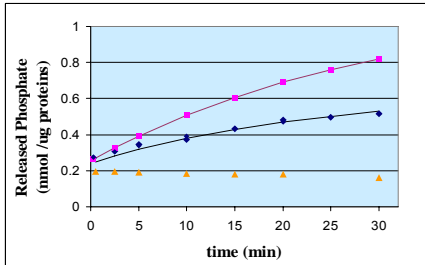


Figura 1. Actividad de tipo ENTPDasa en membranas de retina de pez cebra. Los cuadrados representan la actividad ATPasa y fosfatasa total, la cual se redujo a un 57% en presencia de inhibidores Vanadato: ATPasas de tipo P, N-etilmaleimida; ATPasas de tipo V, levamisol; fosfatasa y oligomicina; ATPasas de tipo F (rombos). Las curvas muestran el ajuste a los datos experimentales por cuadrados mínimos. La actividad en presencia de inhibidores fue abolida completamente con un quelante de cationes divalentes (EDTA, triángulos). Vi: Velocidad enzimática inicial (calculado a partir de las constantes del ajuste).

■ Actividad ATPasa Vi: 0.030 nmol/µg prot.min
◆ Actividad ENTPDasa Vi: 0.017 nmol/µg prot.min
▲ EDTA

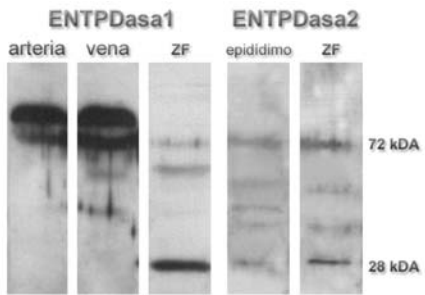


Figura 2. Expresión de ENTPDasas detectada por Western blot en la retina de pez cebra utilizando anticuerpos específicos policlonales contra las ENTPDasas 1 (mN1-Kaly) y 2 (mN2-36) de mamífero. Las bandas de 72 kDa coinciden con los pesos moleculares descriptos para las ENTPDasas en diferentes tejidos. Epidídimo de ratón y arteria/vena de cordón umbilical humano son controles positivos. ZF: retina de pez cebra.

CONCLUSIÓN

- La retina de pez cebra exhibe inmunorreactividad para ENTPDasas de tipos 1 y 2.
- Las ENTPDasas 1 y 2 presentan patrones de distribución diferenciales en las capas retinianas.

Marcador	Tipos celulares y sinapsis	Colocalización ENTPdasa 1	Colocalización ENTPdasa 2
PKC alfa	Bipolares ON	NO	OPL, postsinapsis
RT97	Segmentos ext./int. de fotorreceptores	NO	NO
SV2	Vesículas presinápticas	NO	OPL, presinapsis
ZNS2	conos	OPL, presinapsis	NO

- La retina de pez cebra presenta actividad de tipo ENTPDasa, resistente a inhibidores de las enzimas ATPasas y fosfatasa. EDTA inhibe completamente esta actividad.
- La localización regionalizada de los subtipos de ENTPDasas en las capas retinianas sugiere una regulación diferencial para la señalización mediada por ATP/ADP y la producción de adenosina en los espacios sinápticos.

Agradecimientos: Anticuerpos mN1-Kaly y mN2-36 fueron donados por el Dr. Jean Sevigny (Université Laval, Québec, Canadá). RT-97 y SV2 fueron obtenidos del Develop. Studies Hybridoma Bank, IOWA. Estos estudios se realizaron gracias a los subsidios otorgados por el FONCYT (BID 1728-04 PICT2004), PIP CONICET y la Fundación Antorchas.

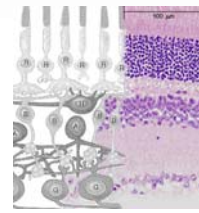


Figura 3 Microfotografía de un corte de retina de pez cebra, y figura con los tipos celulares esquematizados. ONL: capa nuclear externa (núcleos de conos y bastones); OPL: capa plexiforme externa; INL: capa nuclear interna (núcleos de interneuronas); IPL: capa plexiforme interna; GCL: capa de células ganglionares. R: fotorreceptores, H: células horizontales, A: células amácrinas, B: células bipolares, y G: células ganglionares.

ENTPDasa 1

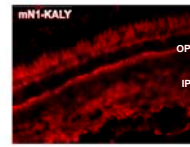
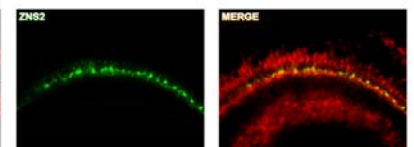
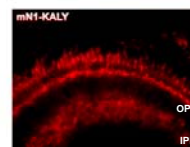
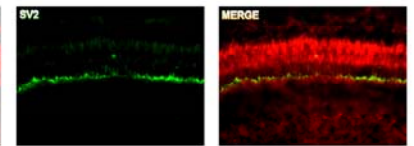
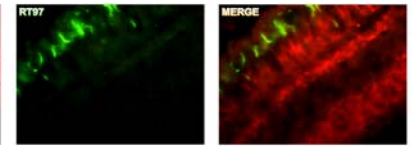
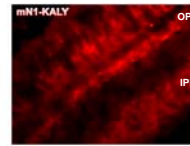
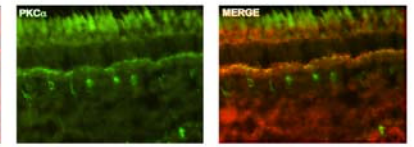
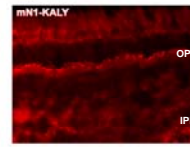


Figura 4. ENTPDasas 1 y 2 detectadas por inmunohistoquímica en retina de pez cebra. El anticuerpo policlonal mN1-Kaly detecta específicamente la ENTPDasa tipo 1, que colocaliza presinápticamente con ZNS2 (marcador de conos). No se detectó colocalización con RT97 (neurofilamentos), PKCα (Bipolares ON) ni SV2 (vesículas sinápticas).



ENTPDasa 2

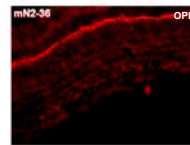
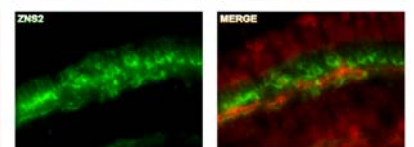
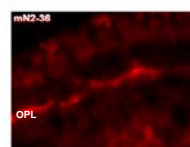
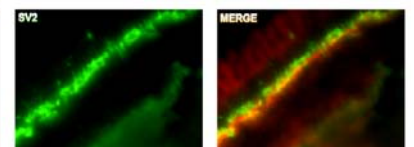
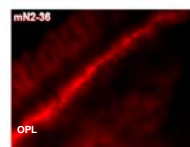
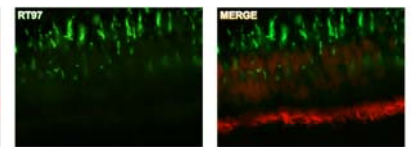
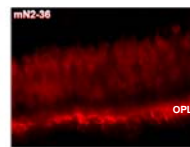
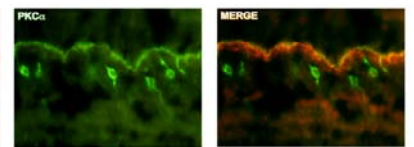
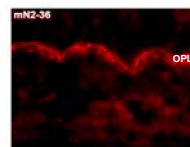


Figura 5. El anticuerpo policlonal mN2-36 detecta específicamente ENTPDasas tipo 2 y colocaliza postsinápticamente con PKCα y presinápticamente con SV2 en la OPL. No se encontró colocalización de la ENTPDasas 2 con RT97, así como tampoco con ZNS2.



Los controles sin anticuerpos primarios o secundarios, o con suero preimmune, fueron realizados sistemáticamente. Magnificación de las imágenes 400x, 600x y 1000x, NA:1.3