

# Expresión y distribución de ectonucleotidasas en la retina de vertebrados.

Lionel D. Alfie, Pablo J. Schwarzbaum and Maria Paula Faillace.

Cita:

Lionel D. Alfie, Pablo J. Schwarzbaum and Maria Paula Faillace. (Abril, 2006). *Expresión y distribución de ectonucleotidasas en la retina de vertebrados. VIII Taller Argentino de Neurociencias. UBA, Fundación Instituto Leloir, Agencia Córdoba Ciencia, IBRO, Huerta Grande Córdoba.*

Dirección estable: <https://www.aacademica.org/lionel.david.alfie/12>

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



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>.*

# EXPRESIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE ECTONUCLEOTIDASAS EN LA RETINA DE VERTEBRADOS

Lionel D. Alfie, Pablo J. Schwarzbaum y Maria Paula Faillace

IQUIFIB. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. E-mail: lionelalfie@hotmail.com; pfaillace@qb.ffyb.uba.ar

## INTRODUCCION

El ATP extracelular, liberado por neuronas y células de la glía, actúa como neurotransmisor y neuromodulador a través de receptores purinérgicos específicos (tipo  $P_2$ ) en el sistema nervioso. La concentración de ATP extracelular es regulada de manera precisa por glicoproteínas de membrana, con dominios catalíticos extracelulares, llamadas ecto-nucleósido-trifosfato difosfohidrolasas (ENTPDasas), que hidrolizan nucleósidos tri- y difosfato. Entre los productos de hidrólisis del ATP, el ADP puede también actuar sobre receptores  $P_2$ . En cambio, el AMP resultante no se une a estos receptores pero puede ser metabolizado en el espacio extracelular por una ecto-5'-nucleotidasa de adenosina, un potente neuromodulador inhibitorio a través de su unión a receptores purinérgicos de tipo  $P_1$ . La actividad de ENTPDasa puede definirse por su: 1) dependencia de  $Ca^{2+}$  o  $Mg^{2+}$ ; 2) insensibilidad a inhibidores de fosfatasa y ATPasas de tipo P, F y V. Las ENTPDasas poseen al menos dos roles principales: 1) terminar con la señalización extracelular inducida por ATP/ADP; 2) regular la producción extracelular de adenosina y por consiguiente su señalización extracelular. Varios subtipos de ENTPDasas se caracterizaron en mamíferos mediante el clonado de sus secuencias codificantes. Dos subtipos principales, las ENTPDasas 1 y 2 se diferencian porque la ENTPDasa 1 exhibe una actividad ADPásica varias veces mayor a la del subtipo 2. Por lo tanto, una distribución heterogénea en las capas retinianas de los diferentes subtipos de ENTPDasas sugiere una regulación regionalizada de la producción de adenosina extracelular así como de terminación de la acción de la señal ATP/ADP sobre sus receptores específicos.

## OBJETIVO

Caracterizar el patrón de expresión y localización de los subtipos de ENTPDasas en las capas y tipos celulares retinianos en vertebrados.

## PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

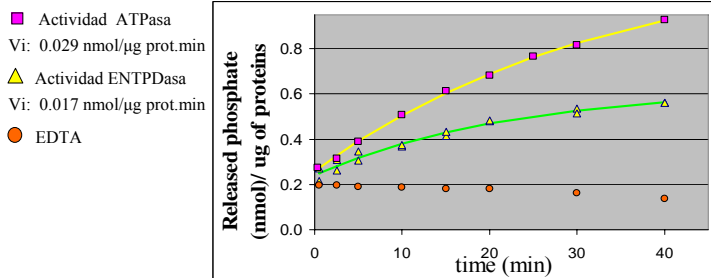
Zebrafish (*Danio rerio*, ZF), goldfish (*Carassius auratus*, GF), y ratón (*Mus musculus*) se utilizaron como se indica en las leyendas de las figuras.

**Western blot:** Proteínas totales de retinas libres de epitelio pigmentario fueron separadas por SDS- PAGE y transferidas a membranas. La expresión de ENTPDasas se detectó utilizando anticuerpos específicos<sup>1</sup> y un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa y un sustrato quimioluminiscente (Perkin Elmer).

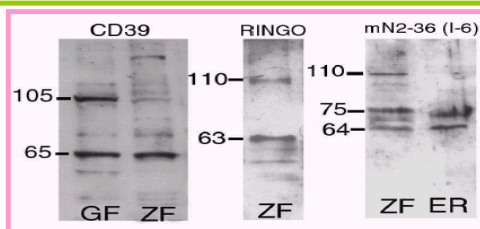
**Inmunohistoquímica:** Crio-secciones de retina (10  $\mu$ m) fueron incubadas con un buffer de bloqueo y varios anticuerpos primarios<sup>1</sup> dirigidos contra ENTPDasas. Un anticuerpo biotinilado, el complejo avidina-biotina-peroxidasa y DAB (Vector) o un anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo (Cy3 o FITC, Jackson) se utilizaron para detectar la unión del anticuerpo primario.

**Actividad en homogenatos de proteínas de membrana:** Se determinó actividad total o Ecto-ATPasa en un buffer conteniendo ATP y [ $^{32}$ P]-ATP. La medición de actividad fue iniciada por el agregado de ATP frío y radiactivo. 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 fosfomolibdico que se extrae con isobutanol. La fase orgánica se separó para cuantificar radiactividad.

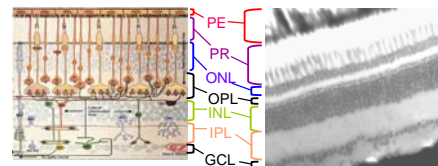
## RESULTADOS



**Figura 1.** Actividad ENTPDasa en homogenatos de proteínas de membrana de retinas de pez. Las líneas verde y amarilla representan el ajuste a los datos experimentales por cuadrados mínimos. Los cuadrados rosa muestran la actividad fosfatasa y ATPasa total. Esta actividad se redujo al 41 % en presencia de inhibidores: 1 mM Vanadato (ATPasas de tipo P), 1 mM N-etilmaleimida (ATPasas de tipo V), 1mM levamisol (Fosfatasa) y 5  $\mu$ g/ml oligomicina (ATPasas de tipo F) (triángulos amarillos). La actividad remanente es probablemente debida a ENTPDasas. La actividad en presencia de los inhibidores fue completamente abolida por EDTA (círculos anaranjados). Vi: velocidad inicial (actividad enzimática).

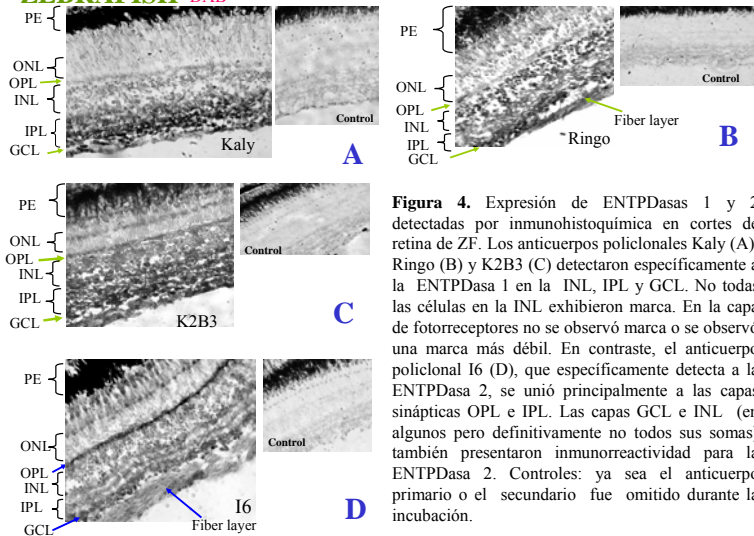


**Figura 2.** La expresión proteica de ENTPDasas es detectada por Western blot en la retina adulta de zebra- y goldfish utilizando anticuerpos contra las ENTPDasas 1 y 2 de mamífero. Los anticuerpos CD39 y Ringo reconocen a la ENTPDasa 1. El anticuerpo  $I_6$  reconoce a la ENTPDasa 2. Las bandas de 63-65 kDa coinciden con el peso molecular (PM) previamente descrito para las ENTPDasas de mamífero en varios tejidos. Las bandas de mayor PM representan probablemente proteínas glicosiladas. GF: goldfish, ZF: zebrafish, ER: epididimo de rata como control positivo.



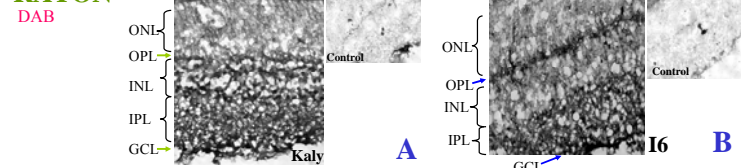
**Figura 3.** Representación esquemática y micrografía de un corte de retina de zebrafish. PE: epitelio pigmentario; PR: capa de fotorreceptores (conos y bastones); ONL: capa nuclear externa (núcleos de fotorreceptores); OPL: capa plexiforme externa; INL: capa nuclear interna (núcleos de interneuronas); IPL: capa plexiforme interna; GCL: capa de células ganglionares; BC: células bipolares; AC: células amácrinas; HC: células horizontales; MC: células de Müller; GC: células ganglionares

## ZEBRAFISH DAB



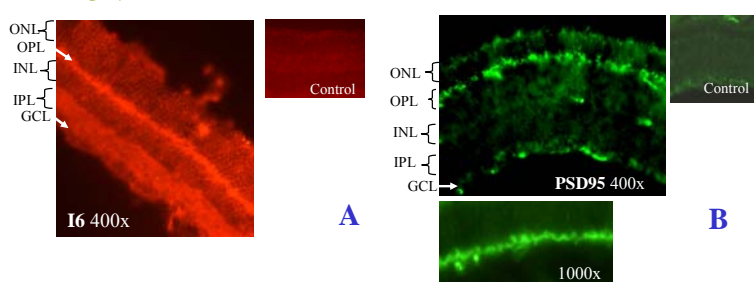
**Figura 4.** Expresión de ENTPDasas 1 y 2 detectadas por inmunohistoquímica en cortes de retina de ZF. Los anticuerpos policlonales Kaly (A), Ringo (B) y K2B3 (C) detectaron específicamente a la ENTPDasa 1 en la INL, IPL y GCL. No todas las células en la INL exhibieron marca. En la capa de fotorreceptores no se observó marca o se observó una marca más débil. En contraste, el anticuerpo policlonal I6 (D), que específicamente detecta a la ENTPDasa 2, se unió principalmente a las capas sinápticas OPL e IPL. Las capas GCL e INL (en algunos pero definitivamente no todos sus somas) también presentaron inmunoreactividad para la ENTPDasa 2. Controles: ya sea el anticuerpo primario o el secundario fue omitido durante la incubación.

## RATON DAB



**Figura 5.** ENTPDasas 1 y 2 detectadas por inmunohistoquímica en cortes de retina de ratón. La marca para ENTPDasa 1 (Kaly, A) y 2 (I6, B) mostró patrones de distribución similares a los observados para las retinas de zebrafish. La ENTPDasa 2 exhibió una mayor inmunoreactividad a nivel de las capas sinápticas (IPL y OPL) mientras que la ENTPDasa 1 presentó una marca más oscura en la retina interna incluyendo la IPL y somas de la INL y GCL. Nuevamente, como en el pez, el patrón de inmunoreactividad mostró una distribución heterogénea. Algunas células resultaron fuertemente reactivas mientras que otras no exhibieron marca alguna.

## RATON Fluorescencia



**Figura 6.** ENTPDasa 2 detectada por inmunohistoquímica de fluorescencia en cortes de retina de ratón para la futura determinación de la colocalización con marcadores retinianos específicos como PSD95. A. I6 revelado con un anticuerpo conjugado al fluoróforo Cy3 (Ab-Cy3), la marca observada corresponde a la descripta para este anticuerpo en la Figura 5B. B. PSD95 revelado con un anticuerpo conjugado al fluoróforo FITC, este marcador retiniano muestra una marca específica en la OPL, principalmente localizado presinápticamente en los terminales de conos y bastones

## CONCLUSIONES

- La retina de vertebrados exhibe inmunoreactividad para dos subtipos principales de ENTPDasas.
- Las ENTPDasas 1 y 2 presentan un patrón de distribución heterogéneo entre las capas retinianas. El subtipo 2 se expresa de manera más conspicua en ambas capas sinápticas en la retina externa e interna. El subtipo 1 está principalmente presente en la retina interna. El análisis de la co-localización de marcadores específicos de tipos celulares retinianos con los subtipos de ENTPDasas permitirá determinar el patrón de expresión a nivel celular de estas enzimas.
- La retina de pez exhibe actividad ENTPDasa resistente a inhibidores de todas las enzimas conocidas con actividad fosfatasa o ATPasa. La actividad remanente puede ser abolida quelando cationes divalentes necesarios para la actividad ENTPDasa.
- Una distribución heterogénea de subtipos de ENTPDasas puede sugerir una regulación diferencial de la señalización extracelular de ATP/ADP así como de la producción de adenosina a través de las capas y subtipos celulares retinianos en vertebrados.

**Agradecimientos** 1. Los anticuerpos fueron donados por el Dr. Jean Sevigny (Université Laval, Québec, Canada). Este trabajo se realizó gracias a los subsidios otorgados por la Fundación Antorchas y CONICET.