

ENTPDASAS: ENZIMAS QUE REGULAN LA CONCENTRACIÓN EXTRACELULAR DE ATP, ADP Y ADENOSINA EN LA RETINA DE VERTEBRADOS. PARTE II: RATÓN

▪

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

Cita:

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

Dirección estable: <https://www.aacademica.org/lionel.david.alfie/16>

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



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 II: RATON

LIONEL D. ALFIE¹, M. JIMENA RICATTI¹, 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.

INTRODUCCION

El ATP es liberado por neuronas y células de la glia y actúa 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 Ca^{2+} y Mg^{2+} 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 ratón.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

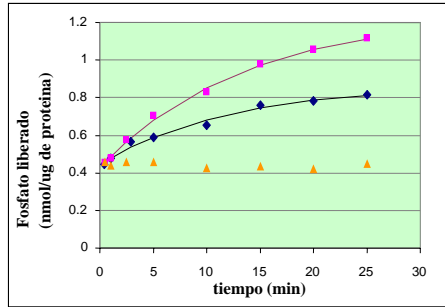
Se utilizaron retinas de ratón (*Mus musculus*).

Actividad en homogenatos de membranas: Se determinó actividad Ecto-ATPasa en presencia de ATP y [γ -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 fosfomolibdico 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 criostato en secciones de 10 μ m. Se incubaron con anticuerpos primarios contra las ENTPDasas y/o marcadores de células retinianas. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con los fluoróforos Cy3 o FITC.

RESULTADOS



■ Actividad ATPasa Vi: 0.062 nmol/ug prot.min
 ◆ Actividad ENTPDasa Vi: 0.033 nmol/ug prot.min
 ▲ EDTA

Figura 1. Actividad de tipo ENTPDasa en membranas de retina de ratón. Los cuadrados representan la actividad ATPasa y fosfatasa total, la cual se redujo a un 55% 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).

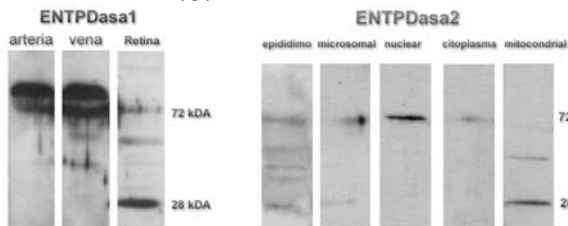


Figura 2. Expresión de ENTPDasas detectada por Western blot en la retina de ratón utilizando anticuerpos específicos policlonales contra las ENTPDasas 1 (mN1-Kaly) y 2 (mN2-36) de mamífero. Las bandas de 72 kDa coinciden con los pesos moleculares descriptos para las ENTPDasas en diferentes tejidos. El fraccionamiento subcelular muestra un predominio de la banda de 72 kDa detectada por mN2-36 en las fracciones microsomal y nuclear. Epidídimo de ratón y arteria/vena de cordón umbilical humano son controles positivos.

CONCLUSIONES

- La retina de ratón exhibe inmunoreactividad para ENTPDasas de tipos 1 y 2.
- La retina de ratón presenta actividad de tipo ENTPDasa, resistente a inhibidores de las enzimas ATPasas y fosfatasa. EDTA inhibe completamente esta actividad.
- 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 (dendritas y somas bipolares)
SV2	Presinapsis (OPL-IPL)	no	OPL presináptico (pies conos), IPL
PSD95	Presinapsis OPL	no	OPL presináptico (pies conos y bastones)
RT97	Células horizontales	OPL, dendritas horizontales	no

- 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.

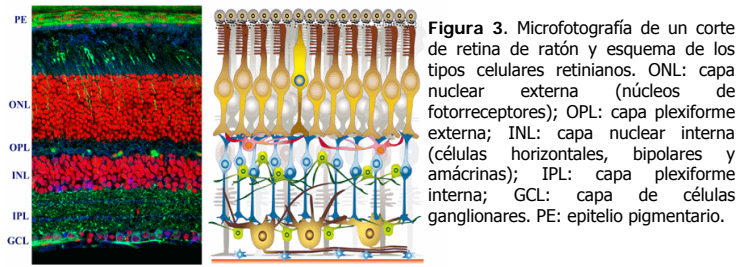
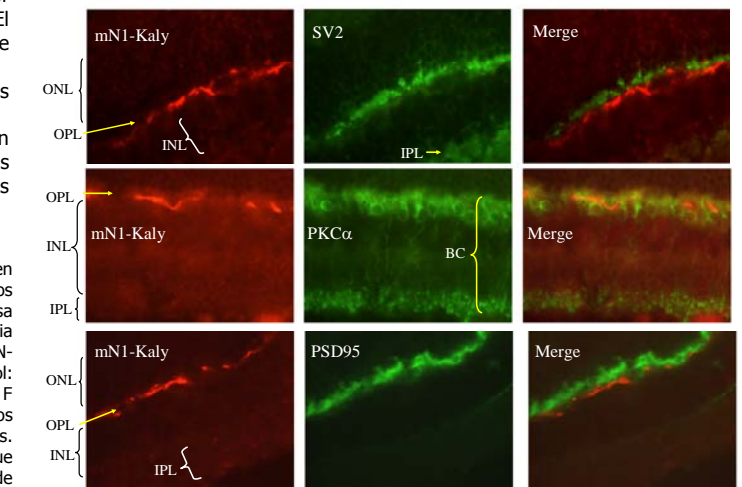
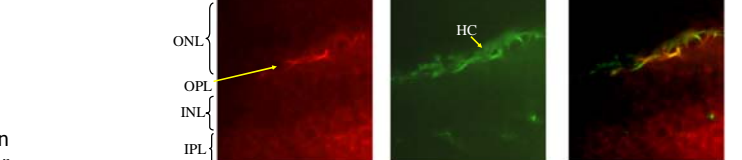


Figura 3. Microfotografía de un corte de retina de ratón y esquema de los tipos celulares retinianos. ONL: capa nuclear externa (núcleos de fotorreceptores); OPL: capa plexiforme externa; INL: capa nuclear interna (células horizontales, bipolares y amácrinas); IPL: capa plexiforme interna; GCL: capa de células ganglionares. PE: epitelio pigmentario.

ENTPDasa 1



ENTPDasa 2

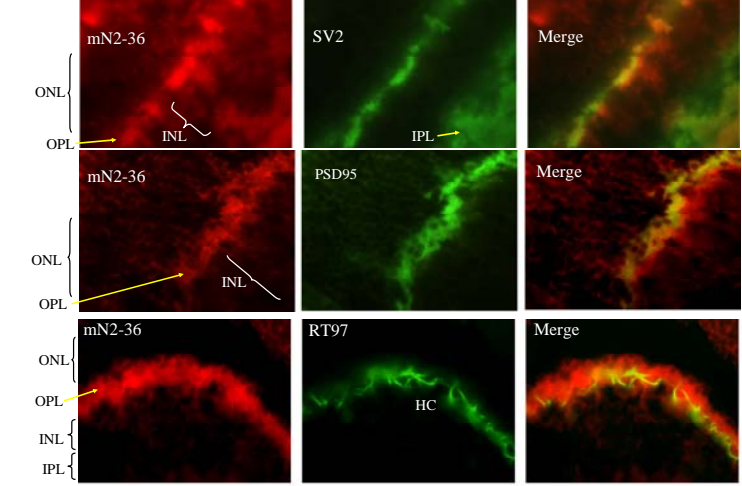
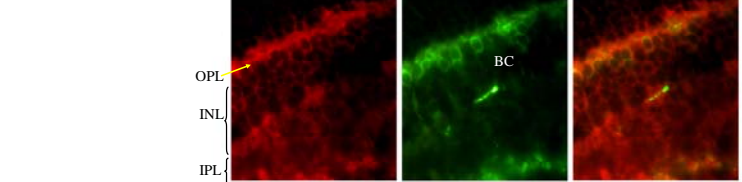


Figura 4. ENTPDasas 1 y 2 detectadas por inmunohistoquímica en retina de ratón. El anticuerpo mN1-Kaly se une a la ENTPDasa tipo 1 que colocaliza con RT97, marcador de células horizontales. El anticuerpo mN2-36 detecta específicamente ENTPDasas tipo 2. Este colocaliza con PKC α en células bipolares ON en la OPL y con marcadores presinápticos como PSD95 (pies fotorreceptores) y SV2 (OPL + IPL). Los controles sin anticuerpos primarios o secundarios, o con suero preinmune, fueron realizados sistemáticamente. Magnificación en todas las imágenes 1000x, NA:1.3. HC: Células Horizontales, BC células bipolares ON