

ACTIVIDAD Y EXPRESION DE ENTPDASAS EN LA RETINA DE DOS ESPECIES DE VERTEBRADOS.

Marien Gautier; Lionel Alfie; Jimena Ricatti; Paula Faillace.

Cita:

Marien Gautier; Lionel Alfie; Jimena Ricatti; Paula Faillace (Noviembre, 2007). *ACTIVIDAD Y EXPRESION DE ENTPDASAS EN LA RETINA DE DOS ESPECIES DE VERTEBRADOS. XXII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Neurociencias. Sociedad Argentina de Neurociencias, Los Cocos, Pcia de Córdoba.*

Dirección estable: <https://www.aacademica.org/lionel.david.alfie/18>

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



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>.

ACTIVIDAD Y EXPRESION DE ENTPDASAS EN LA RETINA DE DOS ESPECIES DE VERTEBRADOS

Marien Gautier¹, Lionel Alfie¹, Jimena Ricatti¹, Paula Faillace^{1,2}

¹Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UBA. ²IQUIFIB-CONICET, Buenos Aires, Argentina.

INTRODUCCION

El ATP es un neurotransmisor en el sistema nervioso central de vertebrados. En la retina, esta molécula media la comunicación entre glia y neuronas. La acción del ATP extracelular sobre sus receptores específicos es principalmente regulada por glicoproteínas de membrana plasmática llamadas ENTPDAsas, que defosforilan ATP a ADP y/o AMP. Existen varios subtipos de ENTPDAsas, entre ellos los subtipos 1 y 2 que presentan importantes diferencias tanto en su distribución como su actividad (Figura 1).

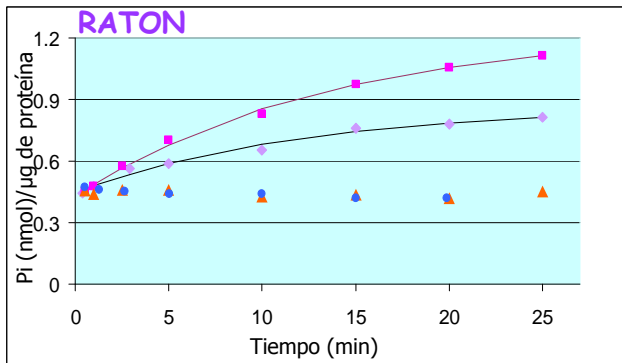
OBJETIVOS

Estudiar la expresión y actividad de las ENTPDAsas subtipo 1 y subtipo 2 en la retina de ratón y de pez cebra.

MATERIALES & METODOS

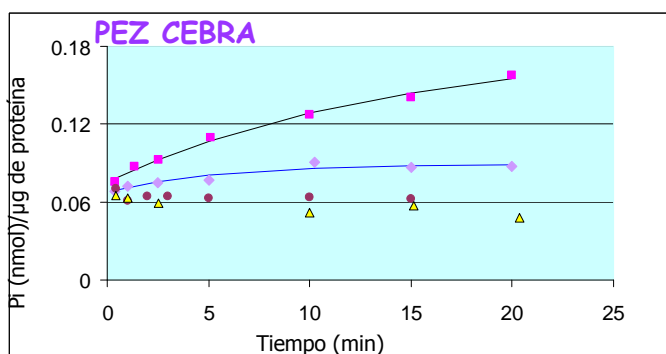
Se utilizaron homogenatos de retinas neurales de pez cebra (*Brachydanio rerio*) y de ratón (*Mus musculus*). **Western blot**, se detectó la expresión de ENTPDAsas utilizando anticuerpos primarios específicos y secundarios acoplados a peroxidasa y un sustrato quimioluminiscente. Se caracterizó la existencia de **actividad ATPásica** en presencia de ATP y [$\gamma^{32}P$]-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 extrajo con isobutanol y se cuantificó la radiactividad de esta fase.

RESULTADOS



■ Actividad ATPasa
 ◆ Actividad ENTPDasa
 ▲ EDTA
 ● Cibacron blue

Vi ATPasa (nmol/µg prot.min) de n=4
 0.055 ± 0.0065 (media \pm SD)
 Vi ENTPDasa (nmol/µg prot.min) de n=4
 0.035 ± 0.0014 (media \pm SD)



■ Actividad ATPasa
 ◆ Actividad ENTPDasa
 ▲ EDTA
 ● Cibacron blue

Vi ATPasa (nmol/µg prot.min) de n=4
 0.015 ± 0.0075 (media \pm SD)
 Vi ENTPDasa (nmol/µg prot.min) de n=5
 0.0092 ± 0.0050 (media \pm SD)

Figura 2. Actividad de tipo ENTPDasa en membranas de retina de ratón y pez cebra. La actividad ATPasa se redujo a un 64% y 61% respectivamente en presencia de inhibidores de ATPasas: Vanadato (tipo P), N-etilmaleimida (tipo V), oligomicina (tipo F) y levamisol (inhibidor de fosfatasa). 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) y un inhibidor de ENTPDAsas (Cibacron blue). Vi: Velocidad enzimática inicial.

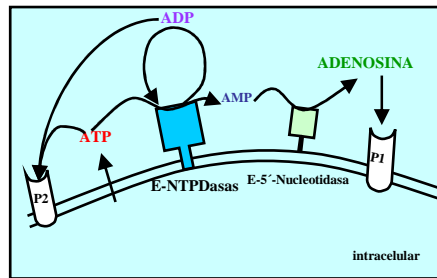


Figura 1. El ATP es liberado por las células al espacio extracelular donde interactúa con receptores específicos purinérgicos y ectoenzimas de membrana. Entre las más activas la ENTPDasa1 hidroliza ATP y ADP en igual proporción mientras que la ENTPDasa2 hidroliza ATP provocando la acumulación de ADP.

RATON

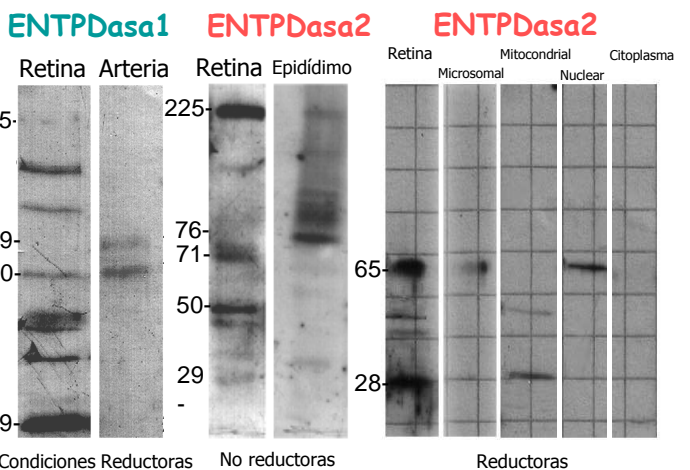


Figura 3. Expresión de ENTPDAsas en la retina de ratón, detectada con anticuerpos específicos contra las ENTPDAsas 1 (mN1-Kaly) y 2 (mN2-36) de mamífero. Las bandas de 65-75 kDa coinciden con los pesos moleculares aparentes descritos para las ENTPDAsas en diferentes tejidos. La banda que corresponde al peso molecular de la ENTPDasa2 monomérica se detecta en las fracciones microsomal y nuclear, sugiriendo su localización en la membrana plasmática. Epidídimo de ratón y arteria de cordón umbilical humano son controles positivos.

PEZ CEBRA

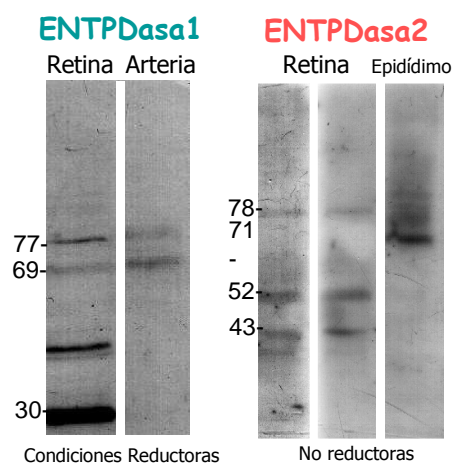


Figura 4. Expresión de ENTPDAsas detectada en la retina de pez cebra con anticuerpos específicos contra las ENTPDAsas 1 (mN1-Kaly) y 2 (mN2-36) de mamífero. Las bandas entre 65-75 kDa coinciden con los pesos moleculares aparentes descritos para las ENTPDAsas en diferentes tejidos. Epidídimo de ratón y arteria de cordón umbilical humano son controles positivos.

CONCLUSION

En este trabajo, se demostró por primera vez que las ENTPDAsas subtipo 1 y 2 se expresan y presentan actividad ATPásica en la retina de ratón y pez cebra. La presencia de ambos subtipos sugiere que el ATP puede ser hidrolizado en un caso (ENTPDasa2) principalmente a ADP y en el otro a AMP (ENTPDasa1), con consecuencias funcionales en cuanto a la activación de dos receptores purinérgicos distintos: P2 (ATP/ADP) y P1 (adenosina) con diferentes vías de señalización intracelular y respuestas fisiológicas.

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.