



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO E INVESTIGACION
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BIOMEDICINA MOLECULAR

"PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA 5'-NUCLEOTIDASA A
PARTIR DEL DUCTO DEFERENTE DE LA RATA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

PRESENTA:

Jesús Ángel Araujo González

DIRECTOR:

Dr. Alejandro Martínez Martínez

ASESORES:

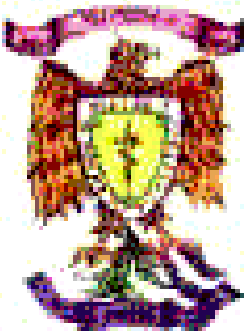
Dr. Guillermo Pérez Ishiwara

Dra. Consuelo Gómez García

Dr. Juan Salas Benito

M. C. Guillermo Bojórquez Rangel

MÉXICO, D.F.
2005





INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
ORDINACION GENERAL DE POSGRADO E INVESTIGACION

CGPI-14

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Juárez, Chih siendo las 11:45 horas del día 11 del mes de agosto del 2005 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de Biomedicina Molecular

para examinar la tesis de grado titulada:

“Purificación de la enzima 5’ nucleotidasa a partir del ducto deferente de la rata”

Presentada por el alumno:

<u>ARAUJO</u> <small>Apellido paterno</small>	<u>GONZALEZ</u> <small>materno</small>	<u>JESÚS ANGEL</u> <small>nombre(s)</small>	Con registro:					
			0	2	1	7	6	3

aspirante al grado de: **MAESTRIA EN CIENCIAS**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Alejandro Martínez Martínez

Dr. Alejandro Martínez Martínez
 Director de tesis

Guillermo Pérez Ishiwara
 Dr. Guillermo Pérez Ishiwara
 Codirector



Juan Salas Benito
 Dr. Juan Salas Benito
 Asesor

M. en C. Guillermo Bojórquez Rangel
 M. en C. Guillermo Bojórquez Rangel
 Asesor

SECRETARIA DE EDUCACION PUBLICA
 INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
 ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA
 SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

Consuelo Gómez García
 Dra. Consuelo Gómez García
 Asesor

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. Guillermo Pérez Ishiwara



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSTRADO E INVESTIGACION

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Ciudad Juárez, Chih el día 11 del mes agosto del año 2005, el (la) que suscribe Araujo González Jesús Angel alumno (a) del Programa de Biomedicina Molecular con número de registro 21763, adscrito a Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Alejandro Martínez Martínez y cede los derechos del trabajo intitulado "Purificación de la Enzima 5' Nucleotidasa a Partir del Ducto Deferente de la Rata", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección jaraujo@uacj.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Jesús Angel Araujo González JAA

Nombre y firma



SECRETARIA DE
EDUCACION PUBLICA
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA
Y HOMEOPATIA
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION

AGRADECIMIENTOS:

La gratitud es un sentimiento que brinda satisfacción y engrandece al ser humano y a su Creador. Por lo que inicio dando gracias a Dios, por haberme permitido llegar a ésta meta más, pues él conoce mis anhelos, mis proyectos y mis necesidades.

Aprovecho la ocasión para expresar mi amor y mi gratitud a mi esposa Alejandra, pues con su apoyo y comprensión me permitieron seguir adelante cuando me sentía desolado.

A mis hijas; Angélica, Yamira y Cinthia les agradezco su paciencia y comprensión por el tiempo que no les pude dedicar durante estos últimos años.

Además, agradezco a todas las personas que de una u otra manera me apoyaron, alentaron y orientaron, para perseverar en el objetivo de obtener un posgrado.

También y de manera especial un sincero agradecimiento y reconocimiento a mi director de tesis, el Doctor Alejandro Martínez Martínez por su tiempo, conocimientos, paciencia y sobre todo por su amistad, pues pienso sinceramente que es un ejemplo a seguir, no sólo, como docente-investigador sino además, como ser humano.

ÍNDICE.

TÍTULO	1
AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE	3
GLOSARIO	6
RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS	8
RESUMEN	10
SUMMARY	12
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Enzimas	14
1.2 Nucleótidos.....	16
1.3 Especificidad de sustrato por la eNT	18
1.4 Las nucleotidasas en la naturaleza.....	20
1.5 Clasificación de las nucleotidasas	21
1.6 Catálisis de la eNT	23
2. ANTECEDENTES	
2.1 Presencia de nucleótidos en vesículas de secreción y exocitosis.	28
2.2 Funciones de las nucleotidasa.....	30
2.3 La 5'-nucleotidasa y sus implicaciones metabólicas.....	32
3. JUSTIFICACIÓN.	35
4. OBJETIVOS.....	38

4.1	Purificar a la 5'-NT del ducto deferente de rata.....	38
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....		39
5.1	Introducción	39
5.2	Determinación de proteínas por el método de Bradford	42
5.3	Medición de la actividad AMPasa	42
5.4	Metodología.....	43
5.4.	Preparación de la curva patrón de fósforo.....	43
5.5	Cálculo de las unidades de actividad AMPasa	45
5.6	Interacción con Con-A Sepharose	46
5.7	Interacción con AMP- Agarose	47
5.8	Perfil de inhibición	47
5.9	Separación de proteína por medio de electroforesis	49
5.9.1	Elaboración del gel de separación.....	49
5.9.2	Elaboración del gel concentrador	50
5.9.3	Preparación de la muestra en buffer de carga	51
5.9.4	Tinción en azul de Coomassie G-250	51
5.9.5	Tinción en nitrato de plata amoniacal	52
5.9.6	Determinación del metal asociado a la enzima	53
5.6	Extracción de RNA total	53
5.6.1	Extracción y electroforesis del RNA	54
5.6.2	Producción de DNAc mediante oligo – dT	57
5.6.3	Amplificación del gen mediante oligonucleótidos específicos	57
5.6.4	Condiciones de PCR	60
5.6.5	Purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa y	

clonación en TOPO – TA	63
5.6.6 Características del vector	65
6. RESULTADOS.....	67
6.1 Extracción y purificación de eNT.....	67
6.1.1 Interacción de S2 con Concanavalina A – Sepharose.....	68
6.1.2 Interacción con AMP – Agarose	70
6.1.3 Caracterización de eNT.....	72
6.1.4 Metal asociado a eNT.....	77
6.2 Extracción de RNA total	77
6.2.1 Obtención de DNAc y amplificación por PCR mediante el uso de oligos específicos	79
6.2.2 Clonación en TOPO-TA	80
7. CONCLUSIONES	83
8. RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS.....	85
9. BIBLIOGRAFÍA.....	86

GLOSARIO.

α - β -MADP:	α - β -metilenadenosina-5'-difosfato.
AMP:	Adenosina 5' monofosfato.
AMPasa:	Fosfatasa o nucleotidasa que hidroliza AMP.
HAS:	Heptamolibdato de Amonio, SDS en ácido.
β GP:	β -glicerol fosfato.
BSA:	Albúmina de suero bovino.
CD73:	Denominación de la 5'-nucleotidasa.
cDNA:	DNA complementario.
cNT-I:	Nucleotidasa citosólica con preferencia por AMP.
cNT-II:	Nucleotidasa citosólica con preferencia por IMP.
cNT-III:	Nucleotidasa citosólica III con preferencia por AMP.
Con A:	Concanavalina A (lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>).
DNA:	Acido desoxirribonucleico.
DEPC:	Diethyl pirocarbonato.
DTT:	Ditiotreitol.
ϵ :	Coefficiente de extinción molar.
EDTA:	Acido etilen diamino tetra acético.
eNT:	Ecto-nucleotidasa (Ecto-5'-nucleotidas).
eNTs:	Ecto-nucleotidasa en forma soluble.
H1:	Primer homogenizado del ducto.
H2:	Segundo homogenizado del ducto.
H3:	Tercer homogenizado del ducto.
IMP:	5'-inosina monofosfato.

kDa y kD:	Kilo Dalton.
Km:	Constante de Michaelis-Menten.
MiliQ:	Agua desionizada grado 1.
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa.
Pi:	Ión orto fosfato (fósforo inorgánico).
RNA:	Acido ribonucleico.
RNAm:	RNA mensajero.
RPM:	Revoluciones por minuto.
RT-PCR:	Retro-PCR
S1:	Primer sobrenadante obtenido de H1.
S2:	Segundo sobrenadante obtenido de H2.
S3:	Tercer sobrenadante obtenido de H3.
SDS:	Dodecil sulfato de Sodio.
TAE:	Tris-ácido acético-EDTA.
TE:	Tris-EDTA.
Tris:	Tris(hidroximetil)-aminometano.

RELACIÓN DE FIGURAS, TABLAS Y ESQUEMAS.

Figura	Página
1.1 Esquema de un nucleósido monofosfato	17
1.2 Hidrólisis del AMP catalizada por eNT	18
5.2 Esquema de extracción de eNT del ducto deferente	41
5.3 Diseño experimental para preferencia de sustrato	49
6.1 Proceso de extracción de RNA total mediante TRIzol	56
6.2 Procedimiento de amplificación oligo específico	59
6.3 Programa para la amplificación de eNT	62
6.4 Esquema de la estrategia TOPO-TA	65
7.1 Actividad enzimática de eNT en las fracciones solubilizadas	68
7.2 Perfil de elusión de la actividad AMPasa	69
7.3 Elusión de AMPasa después de su interacción con AMP-Agarose	71
7.4 Actividad AMPasa de las fracciones posterior a desalado en Sephadex G-25	72
7.5 Linaridad enzimática	73
7.6 Acción de inhibidor α,β - MADP sobre la eNT	74
7.7 Preferencia de sustrato por eNT	75
7.8 Tinción de plata para eNT	76
7.9 Electroforesis del RNA	78
7.10 Producto de amplificación por PCR	80
7.11 Morfología colonial de <i>E.coli</i> en medio de Luria-Bertani	81
7.12 Restricción del vector pCR2.1TOPO con <i>EcoR1</i>	82

Tablas	página
1.1 Ectonucleotidasas de tejido nervioso	24
1.2 Propiedades de nucleotidasas	27
1.3 Dominios conservados en enzimas con capacidad fosfotransferasa	28
5.1 Curva de calibración de fosfato inorgánico Pi	44
5.2 Esquema para determinar actividad AMPasa	45
5.3 Componentes del gel de separación	50
6.0 Concentración de Zn y Cd en eNT	77

PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA 5'-NUCLEOTIDASA A PARTIR DEL DUCTO DEFERENTE DE LA RATA

RESUMEN.

La eNT es una metaloenzima que tiene como cofactor a los iones de Zn^{+2} , se caracteriza por su unión a las membranas biológicas mediante residuos de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), no hidroliza sustratos como β -glicerol-fosfato (β -GP) ni al p-nitrofenil-fosfato (p-NPP), presenta una masa molecular aparente monomerizada de entre 60-80 KDa, y es inhibida fuertemente por el α , β -metilenadenosina 5' difosfato (α , β -MADP). Esta enzima presenta una variedad de funciones dependiendo del tejido y organismo donde se exprese, sin embargo, su actividad enzimática sobre AMP produce adenosina y fosfato inorgánico (Pi). Se presume que la eNT representa la mayoría de las enzimas responsables de la formación extracelular de nucleósidos a partir de nucleósidos 5'-monofosfatos. Así, la eNT juega un papel importante en la producción de adenosina a partir del AMP extracelular y por tanto la adenosina participa en la subsecuente activación de los receptores de adenosina P1. La adenosina y los nucleótidos de adenina (ATP, ADP, AMP) tienen actividad neuromoduladora, sobre receptores purinérgicos de clase P1 y P2 respectivamente.

Posteriormente se encontró que los neurotransmisores ATP y GABA, se coliberan en neuronas en cultivo (Jo and Schlichter, 1999). La coliberación de ATP, GABA y 5'-nucleotidasa soluble ha sido descrita en el ducto deferente, que es inervado por el sistema purinérgico (Todorov et al, 1997). Nuestro interés es describir el grado de participación de la eNT en la degradación de los nucleótidos liberados en sinápsis periféricas, específicamente en el ducto deferente, para ello se pretende clonar parte de la eNT expresada en el ducto deferente de la rata.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en este trabajo.

Se purificó la eNT mediante cromatografía de afinidad en Con-A-Sepharose y AMP-Agarose, esta proteína presentó las características de la eNT: una actividad AMPasa de 600 nmoles de Pi hora⁻¹, al ser incubada con; AMP, p-nitro-fenilfosfato, β -glicerolfosfato ó el inhibidor α, β metilen adenosina 5'-difosfato, presentó las características de actividad e inhibición indican que la enzima purificada corresponde a eNT del ducto deferente de la rata, pues el sustrato preferido es AMP, es inhibida por α, β -MADP y no hidroliza ni al p-NPP ni al β -GP. Mediante SDS-PAGE, se detectó una proteína cuyo peso molecular aproximado es de 66 KDa, lo cual corresponde al rango de peso molecular de eNT.

Además, se clonó un amplicón de aproximadamente 1200 pb a partir del RNA extraído del ducto deferente de la rata, el cual se encuentra integrado al vector de clonación pCR 2.1-TOPO, mismo que se ubica en las células transformadas de E. coli DH5 α almacenadas a -70⁰C.

Summary

Ecto 5'-nucleotidase (eNT) is a metalloenzyme containing Zn as a cofactor, it is known that eNT is expressed in all plasma membranes, where it attaches to it by a glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) moiety, the molecular mass of the monomer is around 60-80 kDa, it prefers AMP over other nucleotides, does not hydrolyze β -glycerolphosphate (β -GP), nor para-nitrophenylphosphate (p-NPP), and it is inhibited specifically by α,β -methylene-ADP (MADP). When incubated with AMP eNT produces adenosine and inorganic phosphate (Pi). It has been assumed that eNT is responsible for the hydrolysis of extracellular nucleotides, producing adenosine, which in turn is a neuromodulator through metabotropic purinergic receptors (P2Y).

In *vas deferens* it has been shown that ATP is a fast action neurotransmitter through ionotropic receptors (P2X). There is evidence for a synaptic release of an enzyme that degrades ATP after it is released in the end plate of the muscle of *vas deferens*, but the nature of this enzyme has not been conclusively demonstrated. As a first step to characterize the enzyme responsible for the hydrolysis of synaptic release of ATP in *vas deferens*, we started to characterize the main enzyme that hydrolyzes AMP (AMPase) of this tissue, that up to now of authors has not previously been addressed. eNT was purified from dissected *vas deferens*. After extracting the tissue a first homogenization was done and after differential centrifugation a supernatant (S2) containing the highest AMPase was subjected to affinity chromatography, by using concanavalin-A-Sepharose (ConA-Seph) and then to AMP-Agarose, after this last step, the enzyme was desalted. The final activity showed a value of 600 nmol Pi produced h^{-1} . The protein analysis showed a single protein band of 66

kDa, and the AMPase activity was inhibited by MADP, but p-NPP, β -GP, were both not hydrolyzed, besides, Zinc was shown to be present in the purified protein. All these characteristics belong to eNT enzyme.

The molecular cloning of the eNT from *vas deferens* tissue was started, an amplicon of 1200 bp was obtained and inserted into a pCR2.1-TOPO vector.

INTRODUCCIÓN

1.1 Enzimas.

Los sistemas enzimáticos permiten la expresión de la vida sobre la tierra, ya que participan en las diversas vías metabólicas regulando finamente su funcionamiento. Un sistema enzimático está conformado por la apoenzima, que es la parte protéica donde se realiza la actividad enzimática, pues allí se encuentran los sitios de unión al sustrato y el sitio activo. Estas presentan un elevado peso molecular, son de naturaleza termolábil y no dializable. Los cofactores orgánicos como las coenzimas de naturaleza no protéica suelen acompañar a la apoenzima facilitándole su actividad y son de naturaleza termoestable, de bajo peso molecular y dializables. Los activadores generalmente son iones metálicos (Segel 1993), los sustratos y productos (metabolitos) y los inhibidores entre otros. Las enzimas son biocatalizadores (Berzelius, 1835; Sumner, 1926) generalmente de naturaleza protéica que reducen la barrera energética de transformación de los compuestos en productos, además, son altamente específicos. Las enzimas llevan a cabo las reacciones de los procesos biológicos que permiten mantener la integridad y estabilidad de las células que componen a los organismos, funcionando como reguladoras de los procesos bioquímicos. Por lo que es importante conocer y valorar la expresión y las implicaciones de las enzimas en organismos "clínicamente sanos" así como también, durante el desarrollo de enfermedades.

La enzimología ha llevado a la utilización de las enzimas en gran número de aplicaciones en distintas áreas como la industria, medicina, fisiología y bioquímica, enfocados a descubrir los mecanismos enzimáticos y funciones no enzimáticas, igualmente importantes (como moléculas de señalización o de anclaje extracelular entre otras funciones). La comprensión y el entendimiento de las reacciones enzimáticas es útil tanto para predecir las condiciones óptimas fuera como dentro de los sistemas biológicos, así como las adaptaciones anatomofuncionales que han adquirido las células a través de la evolución y que propiedades de éstas pueden ser aprovechadas por los biotecnólogos.

Desde el descubrimiento de las enzimas cuando Buchner describió que los procesos de fermentación podían ser llevados a cabo por extractos de levadura, sin necesidad de células vivas, y la purificación de la ureasa (Sumner, 1926), científicos de todo el mundo han dirigido sus investigaciones al estudio de las enzimas y sus propiedades estructurales y funcionales. Además de su relación con la evolución, misma que implica que las enzimas son producto de la selección evolutiva, y que son las moléculas mejor adaptadas en la función que realizan. Actualmente se estudia la manera de modificar los genes responsables de la síntesis de proteínas, de modo que ya se utilizan proteínas diseñadas mediante ingeniería genética por ejemplo en el campo de la Biología Molecular.

En 1934 Reís publicó que las suspensiones de músculo esquelético y de corazón contenían un catalizador capaz de hidrolizar de una manera altamente específica, a pH neutro varios nucleósidos 5' monofosfato, a ésta

enzima se le asignó el nombre de 5'-NT (5'NT ó eNT), ya que cataliza la hidrólisis del enlace éster de los nucleósidos 5' monofosfatos (Zimmermann 1992).

Los nucleótidos tienen funciones importantes en los procesos celulares tales como: a) almacenar, transportar y ceder energía libre la cual se requiere para realizar todos los trabajos biológicos celulares, b) ser biomoléculas precursoras de los ácidos nucleicos (DNA y RNA), c) participar en los mecanismos de señalización intracelular como segundos mensajeros, d) participar como cofactores en diversas reacciones enzimáticas, e) formar parte de neurotransmisores. Considerando todas las funciones anteriores, es necesario estudiar a las enzimas que regulan su síntesis y su degradación, por ello se han realizado numerosas investigaciones sobre la estructura y función de la eNT en el nivel fisiológico.

1.2 Nucleótidos.

Los nucleótidos corresponden químicamente a moléculas de bajo peso molecular constituidos por ribosa o la 2-desoxirribosa, una base nitrogenada (púrica o pirimídica) y un residuo de ácido orto-fosfórico enlazado al azúcar en el carbono 5'.

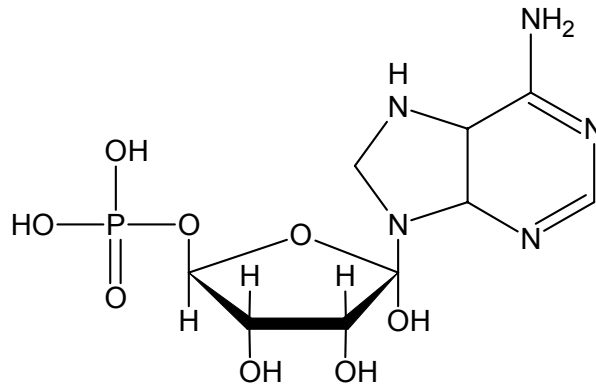


Figura 1.1 Esquema de un nucleósido monofosfato, la adenosina 5'-monofosfato (AMP), el grupo fosfato esta unido al carbono 5' del anillo de la α -D-ribosa y la adenina (base nitrogenada) se encuentra unida al carbono 1' del azúcar.

El compuesto formado mediante la unión de una base nitrogenada y el azúcar ribosa o 2-desoxirribosa recibe el nombre de ribonucleósido o desoxiribonucleósido respectivamente y en forma genérica, nucleósido.

Cuando un nucleósido se encuentra fosforilado se le denomina nucleósido monofosfato o nucleótido; cuando presenta dos fosfatos es un nucleósido difosfato y cuando presenta tres es un nucleósido trifosfato. Por otro lado, existen nucleótidos cíclicos que se unen al azúcar mediante un enlace fosfodiéster entre los carbonos 3' y 5' del azúcar por ejemplo el adenosina 5'-3' monofosfato o AMP cíclico.

El uso farmacológico de los nucleósidos y nucleótidos data del siglo pasado, pues ya en 1920 Freund inyectando adenosina en sangre descubrió que aunque de modo fugaz tiene efectos cardiovasculares disminuyendo la presión sanguínea. La presencia de adenosina y AMP en sangre había sido descubierta por Bass en 1914. La confirmación de que las purinas y los nucleósidos fosfato (AMP, ADP y ATP) ejercían poderosos efectos farmacológicos en corazón y en músculo liso surge de los estudios de Drury y Szent-Györgyi publicados en 1929. Estudios posteriores del grupo de Drury,

utilizando compuestos nucleotídicos y nucleosídicos purificados, confirmaron la potente acción vasodilatadora sobre las arterias coronarias de estos compuestos (Bennet and Drury 1931; Wedd and Drury 1934). Las notables diferencias entre las acciones de la adenosina y el ATP sobre el corazón, fueron primero señaladas por Drury (1936) y posteriormente por Loewi (1949). Acciones sobre otros tejidos fueron también descritas, destacando la motilidad intestinal y la contracción uterina inducida por ATP (Deuticke 1932; Watts 1953).

1.3 Especificidad de sustarto por la eNT.

La eNT cataliza la hidrólisis del enlace éster entre el grupo fosfato y el grupo hidroxilo del carbóno 5' del anillo del azúcar de los nucleósidos monofosfato, aunque la afinidad por el AMP presenta el común denominador de todas la nucleotidasas, éstas enzimas son capaces de hidrolizar diversos nucleósidos púricos o pirimídicos di y trifosfatados, (Dornand y col., 1978, Zimmermann, 1992., Itoh, 1993). También muestran actividad sobre algunos nucleótidos complejos como el FAD (Takei y col, 1969) y la UDP-glucosa (Beachman y Wilson, 1982), además algunas nucleotidasas tienen actividad de fosfotransferasa (Itoh, 1993., Pesi y col., 1994,1996).



Figura 1. 2. Hidrólisis del AMP catalizada por la eNT. La reacción produce adenosina y fosfato inorgánico (Pi). La flecha indica que bajo condiciones fisiológicas, la reacción está desplazada a la derecha.

El hallazgo de formas membranales y solubles de eNT en los tejidos de los mamíferos, así como la presencia de eNT en bacterias y vertebrados invita a estudiar a todas las proteínas con actividad de nucleotidasa a la luz de la selección evolutiva (Zimmermann, 1992). Las formas solubles de la eNT participan en la regulación a nivel intracelular de nucleósidos 5' monofosfatos; la forma ligada a la membrana cataliza la hidrólisis de los nucleótidos hasta el correspondiente nucleósido en el espacio extracelular. Posteriormente por sistemas específicos los nucleósidos son introducidos a la célula en donde eventualmente son regenerados los nucleótidos correspondientes (Johansson y Eriksson, 1996).

La adenosina y los nucleótidos de adenina (ATP, ADP, AMP) tienen actividad neuromoduladora, sobre receptores purinérgicos de clase P1 y P2 respectivamente. Por tanto la excitabilidad neural depende de la concentración relativa de los nucleótidos y nucleósidos, de la actividad de las enzimas implicadas en su génesis y degradación, así como de la afinidad de los sistemas de captura (Burnstock, 1981; Ribeiro y Sebastián, 1987; James y Richardson, 1993). Además de la actividad de fosfohidrolasa la proteína tiene implicaciones en la adhesión extracelular por medio de complejos de laminina y de nidogen (Stochaj y col. 1989; Vogel y col., 1991). Asimismo se encontró que la enzima es un marcador de diferenciación celular llamado CD73 (cluster of differentiation) (Synnestvedt y col. 2002), y que éste antígeno se encuentra presente tanto en las membranas de todas las células de vertebrados incluyendo al hombre, como en las de otros animales (Zimmermann 1992).

Lo más probable es que el papel fisiológico de las nucleotidasas sea dependiente del tejido y del organismo de donde se extraiga.

1.4 Las Nucleotidasas en la naturaleza.

Existe actividad de nucleotidasa en una gran gama de organismos, que va desde las bacterias, levaduras, hongos, plantas y tejidos de vertebrados (Zimmermann, 1992). Se ha identificado el gen eNT en vertebrados, sin embargo, se ha observado que la expresión de éste, produce variantes de la enzima (Cunha y col., 2000). Además, se han encontrado enzimas relacionadas a las nucleotidasas en artrópodos e inclusive en archeas y en eubacterias. Sin embargo como ya se mencionó, las propiedades bioquímicas de la proteína son diferentes en cada organismo. Así por ejemplo en *Vibrio parahaemolyticus* la función hidrolítica de la eNT depende de Cl^- y su secuencia aminoacídica muestra una identidad de un 60% con la UDP-hidrolasa de *Escherichia coli* (Burns y Beacham, 1986). La enzima de la levadura (*Saccharomyces oviformis*) defosforila todos los desoxi y ribonucleósidos 5'-monofosfato pero no tiene actividad sobre los ésteres de fosfatos de los azúcares. Además, ésta enzima es única sobre la actividad de pirofosfatasa frente a NAD^+ , NADH , FAD o ATP (Takei y col. 1969). Se ha sugerido que los sitios activos implicados en las propiedades catalíticas de la actividad de pirofosfatasa y fosfatasa se encuentran en lugares específicos localizados en distintos sitios de la misma enzima (Knofel T, Strater N. 2001).

En vegetales se han encontrado formas de la eNT enzima solubles en la matriz fluida extramitocondrial y formas ligadas a la membrana plasmática, a partir de extractos de patata, tomate, maíz, uva y fracciones microsomales ricas en membrana de Golgi y membrana de retículo endoplasmático (Gupta y Sharma, 1996). Sin embargo, las formas de eNT asociadas a membrana

plasmática y Golgi difieren en tamaño molecular e interacción con sueros de anticuerpos contra eNT, de manera que un antisuero preparado contra la enzima de la membrana plasmática no reconoce a la enzima de Golgi (Gupta y Sharma, 1996). Además, los anticuerpos preparados contra la enzima extraída de membrana plasmática de cotiledones de cacahuete no reconoce tampoco las eNT's de membrana plasmática de guisante, soja, garbanzo o trigo (Gupta y Sharma, 1996). La eficiencia catalítica de eNT varía considerablemente dependiendo de la planta de donde se extraiga, pero al parecer todas las eNT del reino vegetal muestran una actividad máxima a pH ácido (Polya, 1974; 1975; Chong-Maw Kristopeit, 1981; Carter y Tipton, 1986).

1.5 Clasificación de las nucleotidasas.

Se han descrito varios tipos de eNT en diversos tejidos y fluidos de vertebrados. En general estos tipos de enzimas se han clasificado en cinco clases de acuerdo a su localización subcelular y eficiencia catalítica por diversos sustratos (Zimmermann, 1992; Vera Bianchi y Jozef Sychala, 2003).

1. Ecto-5'-NT (eNT) es la enzima de membrana, con K_m por AMP del orden del μM .
2. Nucleotidasa citosólica tipo I (cNT-I) es una proteína citosólica con preferencia por AMP, con una K_m del orden del mM.
3. Nucleotidasa citosólica tipo II (cNT-II) es una proteína citosólica e hidroliza IMP de forma más eficiente que al AMP.
4. Nucleotidasa citosólica tipo III (cNT-III) con una K_m del orden mM.
5. Ecto-5'-NT solubilizada (eNTs), forma soluble de la enzima, al parecer

derivada de la enzima asociada a la membrana (eNT), ya que comparte sus características cinéticas y estructurales.

La mayor parte de la información relacionada con la función fisiológica de la proteína se ha obtenido a partir de tejidos de vertebrados. Las bacterias contienen formas solubles y membranales de la enzima, probablemente codificadas por genes distintos. En plantas también se han identificado formas solubles y asociadas a la membrana en fracciones microsomales de maíz (Carter y Tipton, 1986) y en extractos de los nódulos de raíz de soja (Oestergaard y col. 1991). Pero como siempre, es difícil determinar si las formas solubles de la enzima son intrínsecas al tejido o bien si son productos degradativos de las enzimas asociadas a las membranas.

Existen numerosos tipos de enzimas que tienen el potencial de hidrolizar nucleótidos que se encuentran en el espacio extracelular. Estos grupos incluyen a las fosfatasas alcalinas y la ecto-eNT ancladas a la membrana a través de un enlace glicosilfosfatidilinositol (GPI), éstas enzimas son capaces producir fósforo inorgánico (Pi) de una variedad de compuestos orgánicos, incluyendo la degradación de nucleósidos 5'-mono, di y trifosfatos. (Zimmermann, 1996). Recientemente se ha encontrado actividad de ATPasa en la molécula de asociación celular neuronal (NCAM) (Dzhandzhugazyan, 1993; 1997). En hepatocitos de rata la molécula de adhesión C-CAM es idéntica a la ecto-ATPasa de hígado de rata, pero dicha relación no ha sido confirmada.

En cuanto a la clasificación de las nucleotidasas se ha obtenido un progreso reciente gracias a la identificación molecular de dos nuevas familias no relacionadas a las ectonucleotidasas. La primera familia se trata de enzimas

como una ectoapirasa (ENTPasa), la segunda familia se refiere a las ectofosfodiesterasas/pirofosfatasa (PC-1) también llamadas fosfodiesterasas/nucleotido pirofosfatasa (PDNP) (Zimmermann, 2001).

1.6 Catálisis de la eNT.

En el transcurso de la historia de la eNT, con relación al papel que juega la enzima en los procesos fisiológicos, se han publicado numerosas investigaciones sobre la capacidad hidrolítica de la enzima (Zimmermann 1992). Sin embargo, queda por aclarar aspectos físico-químicos tales como afinidad por sustratos, sustrato preferido, tipo de actividad y su regulación y sobre todo las funciones concretas que desempeña la enzima en los organismos.

Es posible diferenciar varios tipos de nucleotidasas asociadas a membrana, según su preferencia de sustrato (Tabla 1). (Zimmermann, 1996).

Las nucleotidasas citosólicas difieren de las formas membranales en las características cinéticas. Las eNT's además de hidrolizar nucleósidos monofosfato en algunas ocasiones tiene la capacidad de hidrolizar nucleósidos tri y difosfato (Zimmermann 1992).

La capacidad de la eNT para hidrolizar los 5'-desoxiribonucleósidos depende del organismo y el tejido de donde se extraiga. La eNT no hidroliza a los ribonucleósidos 2' y 3' monofosfato ni tampoco hidroliza los esteroisómeros L de los nucleótidos (Zimmermann, 1992). En cuanto a cinética enzimática la eNT hidroliza preferentemente AMP con una relación de V_{max}/K_m de 5 a 20 $\mu\text{M}^{-1}\cdot\text{min}$ (Camici y col. 1985; Dieckhoff y col. 1985; Grondal y Zimmermann, 1987; Flocke y Mannherz, 1991; Zimmermann, 1992).

En cuanto a las formas citosólicas de nucleotidasas, parece que están implicadas en la regulación de la concentración de AMP e IMP intracelulares. Solo se ha encontrado cNT-I en el corazón de vertebrados (Skladanowski y col. 1996). Por el contrario, se ha encontrado que la cNT-II abunda en diversos tejidos de vertebrados y que también se encuentra presente en corazón dentro de células del miocardio (Darvish y Meeting, 1993) (Tabla 1.2). Se ha sugerido que las formas citosólicas de nucleotidasa regularian la vasodilatación arterial mediante la oriducción de adenosina, ocasionando un efecto cardioprotector durante episodios de infarto al miocardio (Skladanowski y col. 1996, Darvish y Meeting, 1993).

ECTONUCLEOTIDASAS EN TEJIDO NERVIOSO			
Ecto-nucleotidasa	Clasificación EC	Sustrato	Producto
Ecto-ATPasa	3.6.1.3	ATP	ADP + Pi
Ecto-ADPasa	3.6.1.6	ADP	AMP + Pi
Ecto-ATP-difosfohidrolasa	3.6.1.5	ATP	AMP + 2Pi
Ecto-adenilato-cinasa	2.7.4.3	ATP + AMP	ADP
Ecto-ATP-pirofosfatasa	3.6.1.8	ATP	AMP + 2Pi
Ecto-5'-NT(eNT)	3.1.3.5	AMP	Adenosina+ Pi
Ecto-fosfatasa alcalina	3.1.3.1	ATP→ADP→AMP	Adenosina+3Pi

Tabla 1.1. Ectonucleotidasas de tejido nervioso. Enzimas que participan en la hidrólisis de nucleótidos libres son formas asociadas a la membrana plasmática de las células nerviosas.

Las formas citosólicas de eNT hidrolizan los ribonucleosidos 5'-monofosfatos. Así como también, son capaces de hidrolizar a los desoxiribonucleosidos 5'-monofosfatos. La enzima cNT-I hidroliza AMP mejor que IMP y es estimulada por ADP pero no por ATP, su K_m cambia cuando se le agrega ADP de sde una K_m del orden mM a una del orden μ M (Zimmermann,

1992) (Tabla 1.2.). La enzima cNT-II prefiere como sustrato a IMP presentando una cinética hiperbólica frente a IMP y sigmoidal frente a AMP. Sus valores de K_m oscilan entre 0.1 y 0.6 mM para IMP y entre 1 y 15 mM frente a AMP (Zimmermann,1992). La cNT-II es ocasionalmente llamada IMPasa (Itoh, 1993). Numerosos estudios realizados en relación de la actividad de la cNT-I frente a análogos de AMP e IMP parecen mostrar que el sustrato preferente de la cNT-I es el AMP (Skladanowski y col. 1996). Razón por la cual se ha propuesto que la cNT-I funciona como una proteína sensora de AMP en las células del miocardio, degradando rápidamente AMP proveniente de la hidrólisis de ATP.

Es probable que la naturaleza del sitio activo de la eNT de hígado de bovino sea de carácter hidrofóbico ya que se sabe que en el centro catalítico participan uno o más restos aminoacídicos que a pH fisiológico presentan una carga negativa -Asp o -Glu y uno o dos restos de His (Harb y col. 1986) que presenta una carga positiva a pH fisiológico.

Datos cristalográficos de la 5'-NT citosólica de *E. coli* muestran que la adenosina se une a un dominio C-terminal. El anillo de la adenina se apila entre Phe 429 y Phe 498. El dominio N-terminal presenta el ligando al grupo metálico y la His117 conservada, los que en conjunto forman la estructura del centro catalítico. Sin embargo, los tres residuos C-terminal de Arginina 375, 379 y 410, que están involucrados con el sitio de unión al sustrato, pueden también participar en la estabilización del estado de transición (Knofel T, Strater N. 2001). Por otra parte, las enzimas fosfoesterasas, con capacidad hidrolítica

sobre restos fosfato de mononucleótidos presentan tres regiones conservadas, denominadas “motivos secuenciales de fosfoesterasa” (Tabla 1.3.) (Koonin, 1994). Mas aún, las tres regiones conservadas de los “motivos secuenciales fosfoesterasa” que coinciden en el sitio catalítico de las fosfoesterasas también se encuentran en fosfoprotein-fosfatasas, esfingomielin-fosfomonoesterasa, apirasa de mosquito, eNT de vertebrados y bacterias. Además éstos motivos se encuentran presentes en diadenosin tetrafosfatasas de bacteria y en una forma muy semejante a eNT de garrapata (*Bophilus*). Todos estos hallazgos sugieren que éstas enzimas utilizan una estrategia catalítica similar para escindir el enlace éster fosfato.

PROPIEDADES ESTRUCTURALES DE NUCLEOTIDASAS				
Tipo de Nucleotidasas	eNT y eNT's	cNT-I	Cnt-II	cNT-III
Masa molecular aparente (kDa):				
Nativa	120 - 160	150	200 - 265	66
Monomerizada	60 - 80	40	52 - 70	33
Km aparente por:				
AMP	1 - 50 μ M	2 - 8 mM	1 - 15 mM	1 - 15 mM
IMP	10 - 50 μ M	-	0.1 - 0.6 mM	----
Efectores:inhibición (i)				
ATP	I	0	a*	0
ADP	I	a*	a*	0
Pi	0	I	I	I
α,β -MADP	i	0	0	0
β GP	-	-	A	A
Con A	i	0	0	0
Metal nativo:	Zn ⁺²	-	-	-
-Hidrólisis de pNPP	No	No	No	No
pH optimo	7.0 – 8.0	6.5	6.0 – 7.0	7.5
Anclaje a la membrana	GPI	-	-	-
Sustratos hidrolizados:				
Sustrato preferido:	AMP	AMP	IMP	AMP

Tabla 1.2. Propiedades de nucleotidasas. Las abreviaturas son las siguientes: α,β -MADP (α,β -metilenadenosina 5'-difosfato), β GP (β -glicerol fosfato); GPI (glicosil-fosfatidil inositol). A* la Km se ajusta al rango del μ M; I (inhibición), a (activación), 0 (sin efecto). Zimmermann (1992); Vera Bianchi y Jozef Spsychala (2003).

DOMINIOS CONSERVADOS EN LAS FOSFOESTERASAS			
Fosfoesterasa	Clase		
	I	II	III
Ap4Asa (E. coli)	YLIG DV HGCYD	LWLT GDL VAR	LVL GNH DLHL
5'-Nucleotidasa (Rata)	MHTND VH SRLE	LLDAG DQ YQG	MAL GNH EFDN
5'-Nucleotidasa (Raya)	LHTND VH ARVE	LLDAG DQ YQG	MAL GNH EFDN
Apirasa (Mosquito)	I HINDL HARFE	YLNAG DNF QFG	MAT GNH EFDN
ushA (E. coli)	LHTND HH GHRFW	LLSG GD INTG	MAI GNH EFDN
Calineurina (rata)	TV CGDI HGQFF	YLFL GDY VDR	LLR GNH ECRH

Tabla 1.3. Dominios conservados en algunas enzimas con capacidad fosfo-transferasa (negritas).

2. ANTECEDENTES.

2.1 Presencia de nucleótidos en vesículas de secreción y exocitosis.

En las células nerviosas y tejidos secretores, es constante la presencia de vesículas y gránulos de almacenamiento, que son esenciales para liberar los neurotransmisores o las hormonas de manera controlada. El mecanismo es dependiente de calcio y se conoce como exocitosis. La presencia de ATP en vesículas colinérgicas que liberan acetil colina como neurotransmisor fue descrito por vez primera en el órgano eléctrico del pez *Torpedo marmorata* (Dowdall et al., 1974; Zimmermann and Denston, 1976; Zimmermann, 1978). El principio de Dale (1935), según el cual cada terminal nerviosa solo puede sintetizar, almacenar y liberar un único tipo de transmisor, frenó de hecho el estudio de las acciones del ATP en las terminales simpáticas y colinérgicas, como neurotransmisor.

Son los trabajos de Burnstock (1976), los que demuestran que las

terminales nerviosas pueden ser mucho más complejas, y que el ATP tenía una función neurotransmisora, acuñando el término de cotransmisión.

La mayoría de los transportadores vesiculares han sido caracterizados desde el punto de vista cinético y molecular (Masson et al. 1999). Este es el caso del transportador vesicular de monoaminas, denominado así por su poca especificidad, ya que es capaz de internalizar dopamina, noradrenalina, adrenalina, serotonina e histamina y otras aminas aromáticas, se designa con las siglas VMAT (del inglés “vesicular monoamine transporter”) y han sido clonadas dos variantes el VMAT-1 y el VMAT-2, este último más abundante en cerebro (Liu et al. 1992, Henry et al., 1994, 1998).

El transportador de acetilcolina, conocido como VAT (del inglés “vesicular acetylcholine transporter”) también ha sido clonado y presenta la peculiaridad de que la secuencia del gen se encuentra dentro de uno de los intrones de la enzima de síntesis de acetilcolina, la colina acetiltransferasa, asegurando de este modo la expresión simultánea de las proteínas requeridas para la funcionalidad y especificidad de las neuronas colinérgicas (Béjanin et al. 1994).

La liberación de nucleótidos no exocítica se puede presentar en caso de traumatismos y tiene una enorme importancia en los procesos de inflamación, y posterior recuperación tisular. Además bajo condiciones fisiológicas y dependiente de estímulos, las células de músculo liso y estriado, las epiteliales, endoteliales, los astrocitos y las neuronas por su zona postsináptica, son capaces de liberar ATP de modo no excitotóxico. No se conoce el mecanismo a través del cual el ATP atraviesa la membrana plasmática en estas células, pero se ha postulado la existencia de una serie de transportadores o canales que

serían miembros de la superfamilia de proteínas ABC (del inglés “ATP Binding Cassette”). Entre sus miembros se encuentran las P-glicoproteínas, involucradas en la expresión del fenotipo MDR (del inglés “multidrug resistance”), con varios genes que confieren resistencia a fármacos (Stein 1997); las que transportan el colesterol, ó el retinol en la membrana plasmática (Scott, 1999); las que permiten la salida de cloruro y otros iones en los epitelios absortivos y pulmonares como la CFRT (del inglés “cystic fibrosis transmembrane conductance regulator”). Tanto la P-glicoproteína, como la CFRT, han sido propuestas como candidatas para realizar la salida no exocitótica de nucleótidos, pero no ha sido demostrado plenamente, aunque es probable que pueda ser alguno de los múltiples genes que contiene esta familia y que está todavía pendiente de asignarle una función (Abraham et al., 1993; Reisin et al., 1994; Li et al., 1996; Gottesman et al., 1995; Schwiebert, 1999).

2.2 Función de las nucleotidasas.

Como ya se mencionó la 5'-NT presenta una variedad de funciones dependiendo del tejido donde se exprese. Así por ejemplo la enzima de linfocitos es una ecto-proteína anclada a la membrana mediante un enlace de glicosilfosfatidilinositol (GPI). Se ha descrito que ésta enzima es un marcador de maduración de los linfocitos T y B. Existen evidencias de su participación en la liberación de prostanoïdes y citocinas inflamatorias, la proliferación celular, el crecimiento, la diferenciación, la fusión, la adhesión y la muerte celular, las interacciones inmunoendoteliales celulares, la agregación plaquetaria y en general la modulación de la respuesta inmunitaria (G. Burnstock 2001).

Se presume que la eNT representa la mayoría de las enzimas responsables de la formación extracelular de nucleósidos a partir de nucleósidos 5'-monofosfatos. Así, la eNT juega un papel importante en la producción de adenosina a partir del AMP extracelular y por tanto la adenosina participa en la subsecuente activación de los receptores de adenosina P1. Además la eNT está involucrada en la adhesión extracelular (Zimmermann, 1992, 1996 a,b; Christensen, 1997; Resta y Thompson, 1997; Airas,1998, Resta y col., 1998; Zimmermann y Pearson, 1998; Zimmermann y Braun, 1999). Se sabe que la eNT es responsable de la hidrólisis de adenosina 5'-monofosfato en numerosos tejidos de vertebrados, en los que está incluido el sistema nervioso. El hecho de que los nucleósidos participen en muchos procesos fisiológicos, se podría explicar debido a que son considerados como metabolitos reguladores (Newby, 1984) y como metabolitos homeostáticos (Schrader, 1990). Así los nucleótidos como el ATP se coliberan con el neurotransmisor tras una excitación de las terminales nerviosas (Smith, 1991; Smith y Lu, 1991) y desde las plaquetas (Born y Cross, 1963). La adenosina extracelular es en parte, el producto de la hidrólisis secuencial del ATP liberado; se cree que el sistema encargado de la producción de adenosina extracelular a partir de ATP, es una ecto-fosfodiesterasa (que produce AMP+PPi) y posteriormente una ecto-5'-NT produce adenosina y Pi. La adenosina extracelular puede inhibir la liberación de ATP, por lo que autorregula su producción; este mecanismo de autorregulación se ha descrito en la agregación plaquetaria (Born y Cross, 1963; Skubitz y col. 1988) así como en la neurotransmisión (Smith, 1991; Smith y Lu, 1991).

Con todo queda por aclarar las propiedades funcionales de las enzimas implicadas en la génesis o conversión de la adenosina y sus nucleósidos precursores derivados de 5' mono, di y trifosfato.

2.3 La 5'- NT y sus implicaciones metabólicas.

Las suspensiones y extractos de distintos tejidos que presentan actividad eNT, después de un periodo de incubación con nucleósidos monofosfatados, rinden fosfato inorgánico y el correspondiente ribo o desoxiribonucleósido. Según la nomenclatura sistemática de la eNT se trata de una fosfohidrolasa (E.C.3.1.3.5).

Desde principios de los sesenta hasta la fecha, la eNT ha sido objeto de numerosos estudios dirigidos a establecer sus propiedades fisiológicas dentro de los tejidos humanos y su uso potencial como marcador de patologías ya que su valoración es de gran utilidad para el diagnóstico de diversas enfermedades hepáticas, hematológicas, neoplásicas (Sunderman, 1990) e infecciosas (Gounaris, 2002). Por ejemplo, en el laboratorio de análisis clínicos actualmente es posible determinar la actividad de la 5'-NT a partir de suero no hemolizado de pacientes mediante métodos de espectrofotometría cuya utilidad clínica es la diferenciación entre la ictericia obstructiva y la hepatocelular, y entre la enfermedad hepatobiliar y la ósea; esto porque el aumento de la 5'-NT sérica responde al aumento de su síntesis provocada en forma específica por la colestasis, ya que ésta enzima no responde a otros mecanismos de inducción enzimática (drogas y alcohol entre otros) (Sunderman 1990).

Su valor de referencia (15U/L) se encuentra aumentado entonces en

pacientes con enfermedad hepatobiliar con obstrucción biliar intrahepática o extrahepática, carcinoma hepático y con cirrosis biliar incipiente. Así pues, es importante investigar las propiedades de la enzima purificada a partir de distintos tejidos y fluidos biológicos ya que el incremento o disminución de su actividad servirá para entender su adecuación funcional e implicaciones patológicas.

Por otro lado, es posible que la eNT participe en la neurotransmisión, pues se ha observado que después del daño cerebral aparece inmunorreactividad para eNT en microglía, células de Schwann, células satélite proliferantes y fibroblastos (Kreutzberg y Barron, 1978), lo que seguramente indica que la eNT participa de alguna manera en los procesos regenerativos del tejido endoneural del sistema nervioso (Kreutzberg y Barron, 1978). Además, en el cerebro maduro la eNT se encuentra principalmente asociada a células gliales, pero en cerebro inmaduro de rata, la enzima abunda en la superficie de células nerviosas en migración (Schoen y col. 1988), lo que lleva a admitir que la enzima puede participar en la neurogénesis. En corteza visual de cachorros de gato (estadio en proceso de remodelación de los centros oculares), la eNT se expresa de manera transitoria de forma paralela al fenómeno de morfogénesis (Schoen y col. 1988; 1990; Bailly y col 1990). Todas estas observaciones sugieren que la eNT participa en las modificaciones de los circuitos corticales que dependen de la actividad motriz (Schoen y col. 1988; 1990). Sin embargo, también es posible que la hidrólisis del AMP observada en el tejido neural tenga lugar por la acción de fosfatasa de la superficie celular distintas de la eNT.

Dado que los receptores de adenosina en cerebro, se localizan sólo

parcialmente junto a la eNT, parece poco probable que en todos los casos haya una correlación entre producción de adenosina, vía eNT, y la acción neuromoduladora del nucleósido. Se ha sugerido que la eNT, ejerce otras funciones, además de la acción enzimática. La enzima del órgano eléctrico de peces y del córtex cerebral de gato contiene el epítipo glicosídico HNK-1, una cadena oligosacárida identificada en otras proteínas de membrana que participan en las asociaciones célula-célula y célula-matriz extracelular (Stochaj y col. 1989 ; Vogel y col,1991). Por tanto es posible que la enzima este implicada en el reconocimiento celular. Diversos datos experimentales favorecen esta hipótesis: 1) la fibronectina y laminina (proteínas de la matriz extracelular) se unen específicamente a la eNT (Risse y col. 1989; Stochaj y col. 1989^a), de modo que la laminina produce estimulación y la fibronectina inhibición de la enzima (Dieckhoff y col. 1986; Tsushima, 1986; Stochaj y col.1989a; 1990; Yamazaki y col. 1991; hito y Yamada, 1991); 2) la interacción de la eNT con fibronectina y laminina se bloquea con anticuerpos contra la enzima (Stochaj y col. 1989a); 3) la eNT incorporada en liposomas fija fibronectina en forma específica y saturable (Stochaj y col. 1989a; 1990); 4) los anticuerpos anti eNT inhiben el desplazamiento de los fibroblastos cuando se les cultiva sobre una base de laminina (Dieckhoff y col. 1986; Codogno y col. 1988; Stochaj y col. 1989a). Todos estos resultados son indicativos de la posible implicación de la enzima en la asociación de las células con la matriz extracelular o con otras células. Puesto que la laminina y la fibronectina pueden ser importantes para la regulación de la proliferación celular y metástasis, es posible que la eNT se comporte como un receptor de los componentes de la matriz extracelular, de modo que la ecto-enzima de las células tumorales

permita su implantación en otros tejidos a través de los elementos del citoesqueleto.

Estudios recientes sugieren que una mezcla de ATPasas es responsable de la producción de ADP, AMP y adenosina, proveniente del ATP liberado en la placa neuromotora del conducto deferente de cobayo. Se ha postulado que la enzima responsable de ésta catálisis es la eNT, y que ésta se libera durante la neurotransmisión. Con todo, queda por aclarar el estado de agregación y estado activo de la enzima liberada. Recientemente se han realizado ensayos histoquímicos y bioquímicos, que sugieren isoformas de eNT en hipocampo de rata. (Cunha y col. 2000).

3. JUSTIFICACIÓN.

La coliberación de dos neurotransmisores inhibitorios en el sistema nervioso central fue demostrada previamente (Jonas et al, 1998). Posteriormente se encontró que los neurotransmisores ATP y GABA, activador e inhibidor respectivamente, se coliberan en neuronas en cultivo (Jo and Schlichter, 1999). Puesto que el ATP y el GABA son coliberados por la misma neurona presináptica, posiblemente en la misma sinápsis, existe la posibilidad de algún mecanismo de cambio de polaridad por la neurona postsináptica, para ser receptiva a uno de los neurotransmisores liberados. Un tercer elemento regulador puede ser añadido en la vía de degradación del ATP, por ejemplo, diferentes tasas de actividad de las ecto-nucleotidasas regularían la acción de los diferentes nucleótidos. Estas ecto-nucleotidasas podrían ser reguladas por 1) su propia concentración durante su coliberación con ATP (Todorov et al,

1997), posiblemente en la misma vesícula del neurotransmisor (Mihaylova-Todorova et al 2001); 2) la membrana postsináptica, como se ha visto en el caso de las ecto-nucleotidasas en las membranas de linfocitos (Peola et al. 1996). En cualquier caso, la regulación de la actividad ecto-nucleotidasa en el sistema nervioso central es desconocida en detalle. Aún más, la regulación de las ecto-nucleotidasas ha sido encontrada en células granulares de cerebelo en cultivo, en éstas células el glutamato aumenta la concentración extracelular de adenosina a través del incremento de la hidrólisis del ADP y AMP, éste incremento en adenosina es inhibido por Dihidroquinato, un inhibidor de la captura del glutamato, por lo que la acción enzimática de las ecto-nucleotidasas parece estar acoplada a la actividad del transportador del glutamato, nuevamente, a través de un mecanismo desconocido (Boeck et al, 2000). Algunos resultados experimentales incluso indican, que existen dominios bifuncionales intra- y extra-celulares, aumentando con esto la participación de la 5'-NT en la comunicación celular (Dieckhoff et al. 1987).

Algunos candidatos de la regulación de la actividad de las ecto-nucleotidasas son, su propia organización estructural (Martínez-Martínez et al, 2000, Fini et al, 2000), el Zinc liberado durante la neurotransmisión, la interacción del citoesqueleto y la matriz extracelular (Stochaj y Mannherz, 1992), e incluso el estado de oxido-reducción de la enzima (Liu and Sok, 2000).

Como puede apreciarse, hacen falta más datos experimentales concernientes a la participación de la ecto-5'-NT, su modulación, e intercambio de estructura en el sistema nervioso y otros tejidos. Estos estudios podrían ser importantes para el entendimiento de la producción de la adenosina, la que produce analgesia en la médula espinal (Patterson et al, 2001). En tal caso la

actividad de la 5'-NT podría ser importante en la producción de la adenosina a partir de la hidrólisis de AMP.

La coliberación de ATP, GABA y 5'-NT soluble ha sido descrita en el ducto deferente, que es innervado por el sistema purinérgico (Todorov et al, 1997). La coliberación central de GABA y ATP ha sido descrita recientemente en neuronas en cultivo de la horquilla dorsal de la médula espinal, en las que los sitios postsinápticos posiblemente coexpresan receptores P2X- y GABA (Jo et al, 1999). La coliberación de un neurotransmisor de tipo excitador (ATP) a la par con otro de tipo inhibitor (GABA) en la misma sinápsis podría tener implicaciones fisiológicas y funcionales importantes porque ésta permitiría el intercambio entre excitación e inhibición en coordenadas temporales. El estado estructural y el origen de la enzima degradadora del ATP (5'-NT) es desconocido.

Otra pregunta interesante es la posible participación de la ecto-5'-NT en procesos de transducción de señales entre las terminales post y pre-sinápticas, como se propone para otras glicoproteínas (Claudepierre et al, 2000).

4. OBJETIVOS.

4.1 Purificar a la enzima eNT a partir de homogenizados del ducto deferente de rata.

Objetivos particulares:

1. Extracción y solubilización de proteínas del ducto deferente de rata.
2. Purificación de eNT y determinación de la actividad específica (AE).
3. Establecimiento de los criterios de pureza (AE) y bandeo en geles de poliacrilamida.

4.2 Extracción del RNA total a partir de homogenizados del ducto deferente de rata para sintetizar cDNA mediante RT-PCR y clonar un segmento de eNT.

5. MATERIALES Y METODOS.

5.1. Extracción de la eNT del ducto deferente de la rata.

Los ductos deferentes de las ratas (Wistar) se obtuvieron mediante el sacrificio y disección de 8 animales, los cuales fueron proporcionados por el bioterio de la UACJ. El peso del tejido obtenido fue de 2.8 gramos, los cuales se colocaron inmediatamente sobre hielo dentro de un tubo Falcon.

El tejido se lavó tres veces con buffer 1 (Tris 20 mM, pH 7.4) y se resuspendió en el mismo buffer a razón de 10 ml/g de tejido. El tejido se homogenizó en un Potter vidrio-vidrio, dando 5 golpes cuatro veces, descansando en lapsos de 30 s (manteniendo el Potter en hielo entre cada descanso). Este homogenizado produjo una mezcla denominada H1, de la que se tomó una alícuota de 4 ml para determinar la concentración de proteína y la actividad de AMPasa. El resto del homogenizado se centrifugó a 3,500 rpm durante 10 min a 4 °C en una centrifuga clínica con un rotor IEC. Del sobrenadante obtenido (S1) y del precipitado (P1) se tomaron alícuotas de 4 ml para determinar proteína y actividad AMPasa. P1 se resuspendió en el buffer 2 (TX-100 1%, Tris 20mM, pH 7.4), manteniéndolo en agitación magnética a temperatura ambiente durante 10 min, en este paso se obtiene el segundo homogenizado (H2), tomándose una alícuota de 4 ml de H2 para determinar la concentración de proteína y actividad AMPasa y el resto del homogenizado se centrifugó a 14,000 rpm (rotor 70 Ti) a 4 °C por 1 h, obteniendo así el segundo sobrenadante (S2) y tomando una alícuota de 4 ml para determinar la concentración de proteína y actividad AMPasa. El homogenizado 3 (H3) se produjo tras resuspender el segundo precipitado, obtenido por la centrifugación

anterior, con el volumen de inicio de la extracción empleando buffer TX-DX que contiene 5% de TX-100 y 2% de desoxicolato en buffer A (NaCl 0.2 M, en amortiguador Tris 20 mM, pH 7.4). La mezcla de P2 con buffer TX-DX se homogenizó de nuevo en el Potter por 30 s, 4 veces en intervalos de 30 s en hielo. El homogenizado resultante se incubó 1 h a temperatura ambiente en agitación magnética para obtener el tercer homogenizado (H3). De éste, se tomó una alícuota de 4 ml para la determinación de la concentración de proteína y actividad AMPasa y el resto se centrifugó a 14,000 rpm (rotor 70 Ti), para obtener el tercer precipitado y el sobrenadante respectivo (S3). La congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se realizó inmediatamente que se obtuvieron las muestras. En la figura 5.2 se esquematiza el procedimiento de extracción de la enzima.

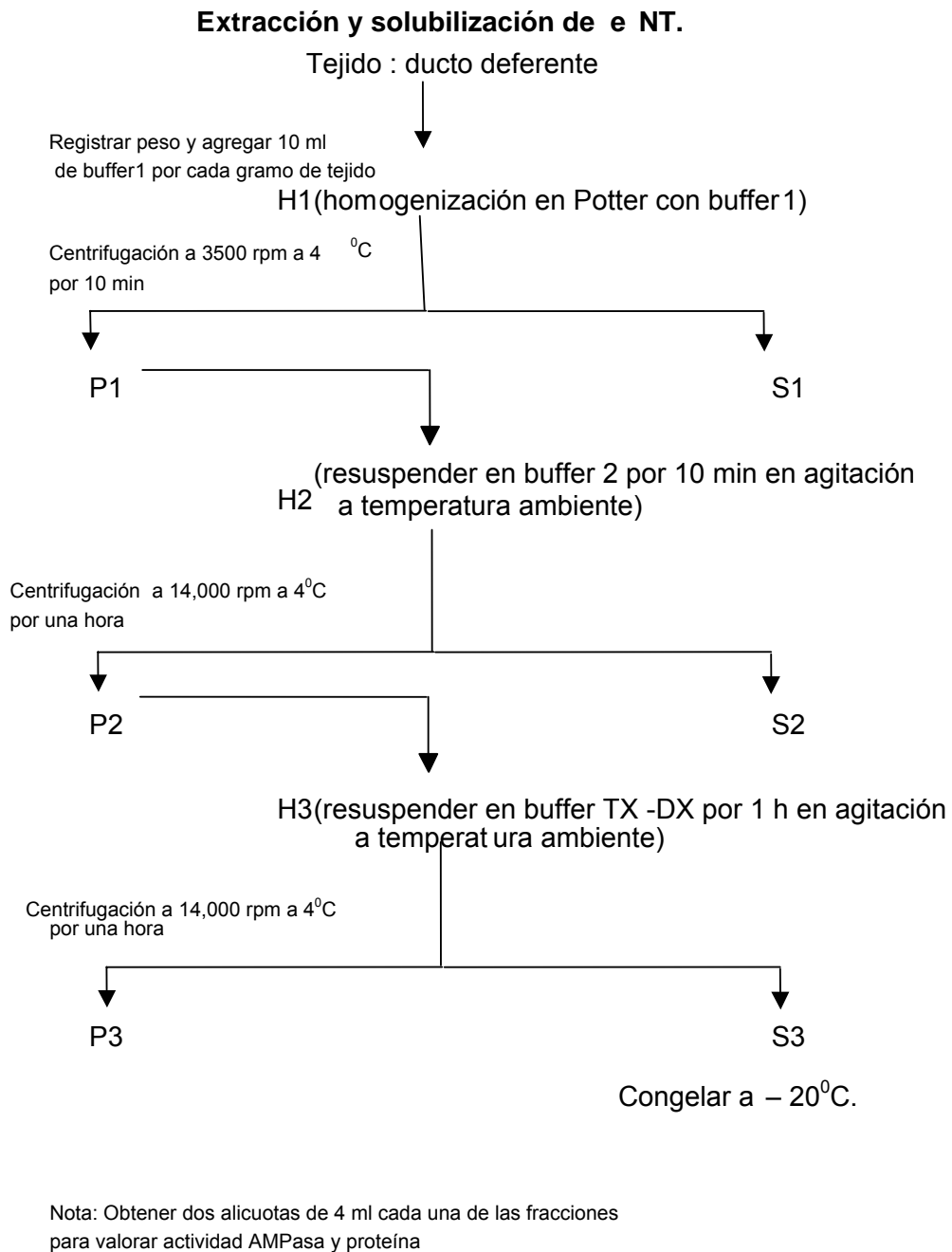


Figura 5.2 Esquema de extracción de eNT: H1, H2, H3 (homogenizados 1, 2 y 3); S1, S2, S3 (sobrenadantes 1, 2 y 3); P1, P2, P3 (precipitados 1, 2 y 3).

5.2. Determinación de Proteína por el método de Bradford.

Los ensayos practicados a las muestras, así como la curva patrón de concentración de proteína se realizaron en microplaca (8X12).

La preparación de la recta patrón con albúmina de suero bovino (BSA) se realizó como se muestra en el siguiente cuadro:

- Solución base de 1 mg/ml de BSA .

Recta patrón de concentración de proteína			
µg/ml	1 mg/ml	H₂O	V_f
150	15 µl	85 µl	100 µl
200	20 µl	80 µl	100 µl
250	25 µl	75 µl	100 µl
500	50 µl	50 µl	100 µl
750	75 µl	25 µl	100 µl

Se tomaron 10 µl de la solución de BSA o de la muestra de concentración desconocida de proteína a determinar y se agregaron 300 µl de solución Bradford. El blanco de reacción utilizado fue con agua.

El ensayo para la cuantificación de proteína se realizó de la misma manera”

- Problema: 10 µl.
- Bradford 300 µl.
- Medir absorbancia a 595 nm.

5.3 Medida de la actividad AMPasa

La actividad de eNT se determinó por medio de la cuantificación del fosfato inorgánico (Pi) que se produce por la hidrólisis del AMP por medio de la participación de las enzimas con actividad AMPasa de las fracciones obtenidas en los pasos del proceso de purificación. El Pi se cuantificó mediante la reacción de Fiske y Subbarow, en ésta reacción el Pi se compleja con

heptamolibdato de amonio en medio ácido y se revela agregando el reactivo de Fiske-Subbarow (Fiske y Subbarow, 1925), produciendo un complejo de color azul que se cuantifica midiendo su absorbancia a 660 nm.

El ensayo de Fiske-Subbarow tiene una sensibilidad del orden nM por lo que es necesario emplear agua MiliQ o su equivalente para determinar la actividad AMPasa. Además se recomienda lavar perfectamente el material de cristal (usar detergentes sin fosfatos) empleado para el procedimiento de purificación y preparación de soluciones para eliminar cualquier interferencia producida por contaminación con fosfatos.

5.4. Preparación de la curva patrón de fósforo

Las concentraciones de fosfato inorgánico (Pi) producido por la actividad de las AMPasas presentes en las muestras se valoraron usando las absorbancias que resultan después de desarrollar el complejo colorido empleando la ecuación de la recta o bien el coeficiente de extinción molar, ambos valores fueron obtenidos elaborando una curva de calibración de Pi. La curva de calibración se estimó midiendo la absorbancia de Pi (31 gr/mol) procedente de concentraciones crecientes de la sal $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (132.1 gr/mol). Para el ensayo se preparó una solución de 1 mg/ml de Pi, ésta solución tiene una concentración de 32 mM de Pi, ésta disolución se diluyó 10 veces para obtener una solución de Pi 3200 μM , enseguida se preparó una última disolución diluyendo la solución 3200 μM diez veces para obtener una solución de Pi 320 μM . El ensayo de la curva patrón se realizó en microplaca de 12 columnas por 8 renglones. Ver tabla 5.1.

Después de colocar los calibradores como se indica se le agrega a cada pozo 250 μl de una mezcla de heptamolibdato-Fiske en una proporción de 28 μl del reactivo de Fiske-Subbarow 0.158 gr/ml a cada ml de solución HAS (heptamolibdato de amonio 0.2 %, H_2SO_4 0.5 M y SDS 2%).

Curva de calibración de Pi					
Punto	μM de Pi	μl de Pi 3200 μM	μl de Pi 320 μM	μl de H_2O MiliQ	Fiske Molibdato*
1	0	0	---	100	250 μl
2	64	20	---	80	250 μl
3	128	40	---	60	250 μl
4	256	80	---	20	250 μl
5	320	100	---	0	250 μl
6	640	---	20	80	250 μl
7	960	---	30	70	250 μl
8	1280	---	40	60	250 μl
9	1920	---	60	40	250 μl
10	2560	---	80	20	250 μl
11	3200	---	100	0	250 μl

Tabla 5.1. Curva patrón de Pi.*el Fiske-Molibdato para 100 ensayos se prepara mezclando 25 ml de heptamolibdato en medio ácido (heptamolibdato de amonio al 0.5 %, H_2SO_4 0.5 M y SDS al 2%) con 700 μl del reactivo de Fiske-Subbarow a una concentración de 0.158 gr en 1 ml.

Se incubó a 37°C por 20 min la reacción de Fiske-Subbarow y se determinaron las absorbancias a 660 nm en el espectrofotómetro de microplaca Benchmark Plus de Bio-Rad. Para estimar el coeficiente de extinción molar del complejo fosfomolibdico se graficó la absorbancia de los puntos de la curva contra su correspondiente.

5.5. Cálculo de las Unidades de actividad AMPasa

Para determinar la actividad AMPasa de las muestras obtenidas durante el proceso de solubilización y purificación de la eNT se elaboró una curva patrón de Pi por duplicado, la ecuación que define a ésta curva patrón cuyo comportamiento es lineal sirvió para calcular la concentración a partir de la absorbancia de las muestras después de la reacción de Fiske y Subbarow tras incubar las fracciones protéicas con AMP como sustrato. La tabla 5.2 ilustra un ensayo de actividad.

Ensayo para determinar actividad AMPasa			
Fracción	V. de la muestra	Buffer	AMP 50 mM
Muestra	50 µl	25 µl	25 µl
Mezclar vigorosamente e incubar en baño a 37 °C . Durante 30 min. Agregar 200 µl de TCA al 10 % Centrifugar a baja velocidad y tomar 100 µl Agregar 250 µl de la mezcla HAS-Fiske-Subbarow* al sobrenadante. Incubar por 20 min y leer absorbancia a 660 nm.			

Tabla 5.2 Esquema para determinar la actividad AMPasa. Se ejemplifica como se determinó la actividad de una muestra la cual se incubó con AMP durante 30 min a 30 °C. Posteriormente se realizó la reacción de Fiske-Subbarow para determinar el Pi producido por las AMPasas presentes. * La mezcla HAS contiene solución de Heptamolibdato amónico 0.2 % en 0.5 M de H₂SO₄ , SDS al 2 % y el reactivo de Fiske-Subbarow (0.158 gr/ml) en una proporción de 28 µl de Fiske por cada ml de solución de heptamolibdato y al sobrenadante.

La actividad enzimática de las muestras con capacidad de hidrólisis sobre el AMP en $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ a 37 °C se calculó con la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{(t_f-t_i)} \times \frac{1}{\varepsilon} \times \frac{V_{mr}}{V_{ez}} \times \frac{V_{TCA}}{V_r} \times \frac{V_f}{V_{ste}} = \mu\text{mol Pi} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} \quad \text{Ecuación 1}$$

Ecuación 1. Ecuación para calcular μmol de fosfato inorgánico producido por acción de AMPasas. (t_f y t_i) se refieren al tiempo final e inicial de la reacción respectivamente; (ε) Coeficiente de extinción molar y sus unidades están dadas de acuerdo a las concentraciones de los patrones en este caso $0.9 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; (V_{mr}) volumen de la mezcla de reacción ($100 \mu\text{l}$); (V_{ez}) volumen de la enzima añadida ($50 \mu\text{l}$); V_{TCA} es el volumen de TCA agregado para precipitar proteína ($200 \mu\text{l}$); (V_r) volumen de la alícuota de la reacción; (V_f) volumen final de la reacción de Fiske Subbarow ($350 \mu\text{l}$) y (V_{ste}) volumen del sobrenadante después de agregarle el TCA ($100\mu\text{l}$).

5.6. Interacción con Con-A Sepharose.

El sobrenadante 2 (S2) con actividad AMPasa se descongeló y se mezcló con Con-A-Sepharose en una proporción de 1ml de Con-A por cada 10 ml de muestra, la resina fue previamente lavada con 10 volúmenes de 0.1% de TX-100 en tampón A (Tris 20 mM, NaCl 200mM, pH 7.4) (TST). La mezcla se dejó en agitación orbital continua durante toda la noche, a 4 °C y posteriormente, se empacó en una columna cromatográfica adecuada. Para eliminar las proteínas débilmente unidas a la resina, la Con-A Sepharose se lavó con 10 volúmenes de amortiguador TST. Las proteínas fuertemente unidas a la resina se eluyeron con 15 volúmenes de metil- α -D-manopiranosido 0.4 M en tampón TST, a una velocidad de flujo de 0.1 ml/min. Se colectaron por lo menos 20 fracciones de 2 ml cada una, en las que se les midió proteína y actividad AMPasa. Las fracciones con elevada actividad AMPasa se mezclaron y se congelaron a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ para pasarla por la siguiente columna.

5.7. Interacción con AMP-Agarose

La mezcla de proteína con elevada actividad AMPasa obtenida tras el pase por Con A- Sepharose se descongeló a temperatura ambiente, y se mezclaron con AMP-Agarose en una proporción de 1 ml por cada 10 ml de muestra, la resina fue previamente equilibrada con 10 volúmenes de tampón TST. Las proteínas y la resina equilibrada se colocaron en agitación orbital continua durante toda la noche a 4 °C. Para eliminar las proteínas débilmente unidas a la resina el AMP Agarose se lavó con 10 volúmenes de TST y se eluyó con 5 volúmenes de AMP 10 mM en tampón TST, a una velocidad de flujo de 1.5 ml cada 20 min. Se recogieron 20 fracciones y se les determinó actividad AMPasa. Posteriormente, para eliminar el exceso de sales, detergentes, el piranosido el AMP la adenosina y el Pi de las muestras con actividad AMPasa se pasaron a través de una columna con 10 ml de Sephadex G-25 equilibrada con NaCl 0.2 M en tampón Tris 20 mM, pH 7.4. Se recogieron 15 fracciones a una velocidad de flujo de 0.75 ml/min. Se valoró la actividad de AMPasa en cada una de las fracciones, mezclando aquellas con mayor actividad. Las muestras se almacenaron a -20 °C y se emplearon para la caracterización bioquímica.

5.8 Perfil de inhibición.

Después de pasar la muestra (S2) a través de las columnas de purificación de Concanavalina A-sepharose y AMP-agarose, se determinó la actividad enzimática de cada una de las fracciones por el método de Fiske-Subbarow anteriormente mencionado y se seleccionaron aquellas fracciones de mayor actividad frente al sustrato preferido (AMP).

Después de seleccionar y mezclar las muestras con mayor actividad de AMPasa eluidas del segundo desalado se procedió a determinar su linealidad, para lo cual se diseñó el siguiente trabajo experimental: se rotularon tres tubos eppendorf, a los cuales se le agregó; 50 μ l de la muestra, mezclándose con 50 μ l de AMP 10 mM en 400 μ l de amortiguador Tris 10 mM pH 7.4 a cada uno de ellos, a ésta se le denominó mezcla de reacción. De la mezcla anterior se tomaron 50 μ l de cada tubo (por triplicado) los cuales se depositaron en otro tubo, el cual contenía 100 μ l de TCA al 10% y la preparación se congeló a -20°C para posteriormente cuantificar fosfatos por el método de Fiske-Subbarow, esta reacción se considera como tiempo cero. Los tres tubos eppendorf se colocaron en incubación a 37°C , y cada 20 min se tomaron 50 μ l de cada una de las mezclas de reacción y se depositaron en 100 μ L de TCA al 10% congelándose cada preparación, y así cada 20 min hasta un tiempo de 120 min.

Al término de 2 h se descongelaron las muestras y se realizó la determinación de Pi, tomando 100 μ l de la muestra a los que se le adicionaron 250 μ l del reactivo de Fiske-Subbarow, método convencional citado anteriormente.

Además, se incubó a la enzima con otros sustratos tales como: para-nitrofenilfosfato 1 mM (pNPP) y beta glicerolfosfato 1 mM (β -GP), siendo el primero el sustrato preferido de las fosfatasas alcalinas, mientras que se sabe que el β -GP no es hidrolizado por la enzima eNT, así como también se incluyó el inhibidor competitivo α , β - metilenadenosina 5'-difosfato 1 mM (α , β -MADP) de la eNT, para lo cual se realizó un procedimiento semejante al que se describe en el anterior trabajo experimental.

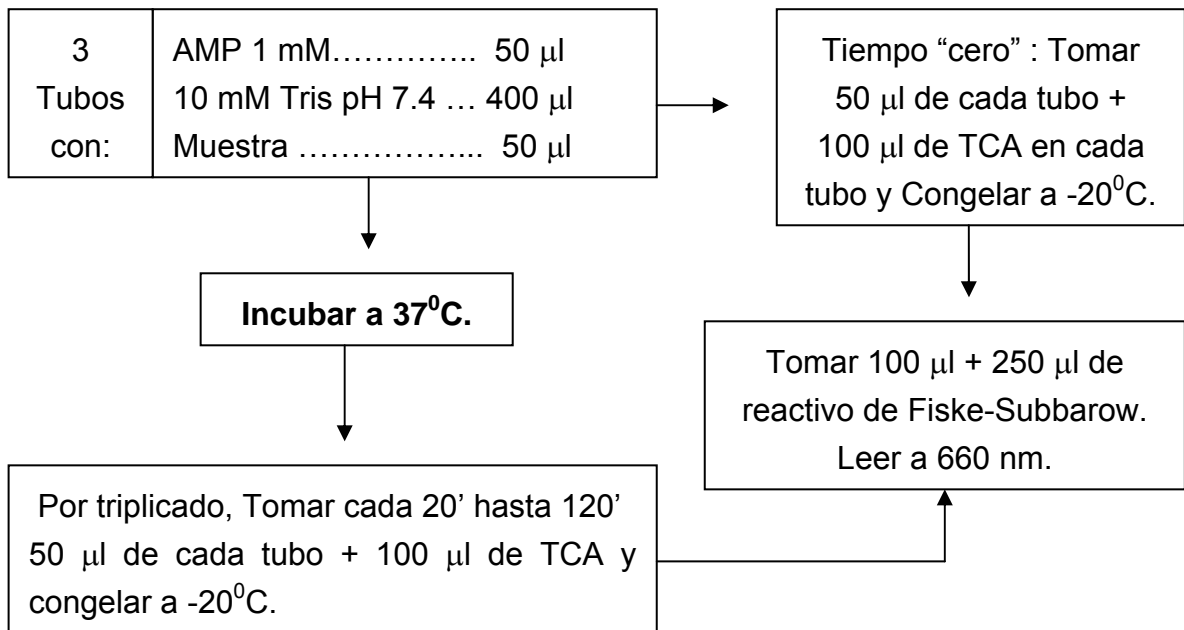


Figura 5.3. Diseño experimental para determinar preferencia de sustrato e inhibición enzimática de eNT.

5.9 Separación de proteínas por medio de electroforesis

Para la separación de proteínas se emplearon los aparatos de electroforesis Miniprotean III de Bio-Rad y las cantidades de los reactivos empleadas fueron ajustadas del protocolo original (Laemmli, 1970).

5.9.1 Elaboración del gel de separación

Se ensamblaron los vidrios de electroforesis en la base de ensamblado del aparato para electroforesis de acuerdo a las especificaciones del manual para Miniprotean III de Bio-Rad.

La solución del gel se preparó mezclando los componentes que se indican en la tabla 5.3. El porcentaje final de acrilamida/bisacrilamida fue del 10 %, que generalmente es el porcentaje empleado para la separación de proteínas de un peso molecular de 16 a 70 kiloDaltons (KDa).

Una vez mezclados perfectamente todos los componentes de la solución del gel de separación, se vertió en el hueco que queda entre los vidrios hasta un centímetro (aproximadamente) antes de llegar al borde del vidrio. Se le agrego una capa de etanol al 70% hasta que se polimerizo el gel.

Gel de separación al 10%	
Soluciones madre	Volumen en ml
Acrilamida 30% / bisacrilamida 0.8%	1.67
Tris-Cl/SDS 4X pH 8.8	1.25
H ₂ O destilada	2.08
Persulfato de amonio al 10%	0.02
TEMED	0.01
Volumen final	5.03

Tabla 5.3. Componentes del gel de separación, todos los componentes se mezclaron en un vaso de precipitado de 10 ml con agitación magnética y se vertieron en el hueco que queda entre los vidrios de electroforesis previamente ensamblados.

5.9.2 Elaboración del gel concentrador

Se retiro el alcohol y el residuo de este se elimino con agua destilada.

Para elaborar el gel de compactación se mezclaron en un vaso de precipitado de 5 ml 0.39 ml de Acrilamida 30%/Bisacrilamida 0.8%, 0.75 ml de Tris-Cl/SDS 4X pH 6.8, 1.83 ml de agua destilada, 15 µl de persulfato de amonio al 10% y 3 µl de TEMED. Se agitó vigorosamente la mezcla y se

vertió arriba del gel de separación. Inmediatamente después se colocó un peine de teflón de 10 carriles y se dejó polimerizar.

5.9.3 Preparación de la muestra en buffer de carga

Para preparar las proteínas se diluyó una fracción de la muestra en buffer de carga SDS 2X en una proporción 1:1 y se calentó en baño a 100 °C por 5 min en un tubo eppendorf.

Se removió el peine de los vidrios y los geles se colocaron en la cámara de electroforesis y la cámara se llenó en los compartimientos de los electrodos con buffer de electroforesis (Tris-Cl 1X, glicina-SDS). Una vez montado el gel en la cámara de electroforesis se cargaron las preparaciones de proteínas y el estándar de peso molecular en los carriles del gel. Se corrió la electroforesis por 40 min (hasta 3 cuartas partes del gel) en la cámara con un voltaje de 100 Volts proveídos por una fuente de poder. Al finalizar la separación de proteínas se desarmó la cámara de electroforesis y el corrimiento de las moléculas polipeptídicas se reveló con Azul de Coomassie, con plata o bien, las proteínas fueron transferidas para su posterior interacción con anticuerpos.

5.9.4 Tinción en Azul de Coomassie G-250

Para teñir las proteínas que se encuentran en los geles de acrilamida se emplearon los métodos de tinción de Azul de Coomassie y de plata. La tinción de Coomassie es empleada para detectar proteínas en un rango aproximado de los μg . Operativamente en la tinción se colocó el gel en un recipiente al que se le añadieron 50 ml de solución de tinte y se mantuvo en agitación continua

durante una h a temperatura ambiente. La solución de tinte se prepara disolviendo el Coomassie G-250 (0.1 %) en solución fijadora (metanol al 40 %, ácido acético al 20 %). En este paso las proteínas no solo se tiñen sino que además se fijan. Posteriormente para eliminar el exceso del colorante y visualizar las bandas de proteínas se colocó el gel en un recipiente con solución de destintado (etanol 40 %, ácido acético al 5 %) cambiando la solución continuamente hasta que se observe el contraste entre las bandas y el gel.

5.9.5 Tinción en Nitrato de plata Amoniacal

La tinción de plata se realizó mediante el método descrito en (Protocols Used at NCI & Related Information). Todos los ensayos de tinción de plata fueron realizados empleando accesorios perfectamente limpios y agua MiliQ o su equivalente, y a temperatura ambiente. Esto es necesario para eliminar la formación de cualquier complejo que interfiera con el revelado de la banda proteica.

Durante el procedimiento los geles se colocaron en solución fijadora (etanol 30%, ácido acético 10%) por 1 h, posteriormente lavados con H₂O MiliQ por 1 h. Los geles se tiñeron en la solución de nitrato de plata amoniacal (Sol."A": 21 ml H₂O MiliQ, 0.2 ml NaOH 10 N, 1.3 ml NH₄OH, Sol."B": 1.5 gr AgNO₃, 4 ml H₂O MiliQ. Para 100 ml.) durante 1 h . Enseguida, los geles se lavaron tres veces con H₂O MiliQ. A continuación se colocaron los geles en solución de revelado (0.1% formaldehido, 0.01% ác. citrico) 10-15 min (hasta desarrollo de color). Finalmente se detiene el revelado con 100 a 150 ml de la

solución “stop” (ácido acético 2%), posteriormente se equilibró con agua MilliQ y se laminaron entre dos capas de celofán.

5.9.6 Determinación del metal asociado a la enzima.

La concentración de Zn y Cd, fue determinada utilizando espectroscopía de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (en un espectrómetro Perkin Elmer Optima 4300 DV). Después de realizar el ensayo para determinar la sensibilidad del instrumento se introdujeron los siguientes parámetros: flujo del nebulizador, 0.8 L min⁻¹; poder de radiofrecuencia 1450; velocidad de inyección de la muestra, 1.50 ml min⁻¹; tiempo de lectura, 10 s. tiempo de lavado entre muestras, 60 s. no se utilizaron estándares internos y cada muestra se leyó por triplicado. La curva de calibración se obtuvo utilizando el blanco y cuatro puntos y los coeficientes de correlación obtenidos fueron de 0.999 o mayores.

5.6 EXTRACCION DEL RNA TOTAL

La extracción de RNA se realizó utilizando el reactivo TRIzol, el cual puede usarse para el aislamiento de RNA total de células y tejidos. El reactivo, una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina, es un método que mejora el aislamiento de RNA en un sólo paso a partir del método desarrollado por Piort Chomczynski y Nicoletta Sacchi (1987).

5.6.1 Extracción de RNA total y electroforesis.

La extracción se realizó a partir del ducto deferente de rata. Todo el material que se utilizó fue estéril, libre de RNAsas y DNAsas. Para triturar el tejido se utilizó un Potter (vidrio-vidrio) previamente lavado y horneado a 150° C por 12 h. Para este ensayo se sacrificó una rata (Wistar) a la cual se le extirpó el ducto deferente de ambos testículos colocándose en una caja Petri previamente pesada, como se muestra:

Caja Petri + 1 ml de Trizol	21.5455 g.
Caja Petri + 1 ml de Trizol + tejido	21.8056 g.

Obteniendo aproximadamente: 0.2601 g. equivalente a 260 mg.

El tejido se pasó al Potter, se le agregó 1.5 ml más de Trizol, y se trituró hasta que quedó una consistencia homogénea. En seguida se distribuyó en 4 tubos eppendorf con aproximadamente 500 μ l c/u, inmediatamente después se agregó 100 μ l de cloroformo a cada uno de los tubos y se agitó manualmente por 30 s.

Se procedió a centrifugar por 15 min. a 10,500 rpm a 4° C en una centrífuga eppendorf Brinkmann Instruments Inc., se recuperó el sobrenadante y se pasó a tubos nuevos. En éste paso la muestra se separó en 3 fases: la del fondo que equivale a una mezcla de fenol – cloroformo de color roja; ésta es la fase orgánica donde se encuentran los restos celulares, la intermedia la cual contiene DNA y proteínas, y la superior incolora que es donde se encuentra el RNA. Este se precipitó con 0.5 ml (500 μ l) de isopropanol, se incubó por 10 min. a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 10,500 rpm por 10 min. a 4° C. Al sacar los tubos de la centrífuga se observa una pastilla

blanca en el fondo del tubo, éste es el RNA, por lo que con cuidado se descartó el sobrenadante y se dejó secar los tubos. Las pastillas se resuspendieron en 50 μ l de agua DEPC y se procedió a su congelación a -80°C , (ver figura 6.1), para posteriormente realizar una electroforésis en una cámara previamente lavada con agua y NaOH para eliminar RNAsas que puedan degradar el RNA, lo cual permite evaluar la cantidad e integridad del RNA. Durante el corrimiento electroforético las moléculas de RNA migran a una tasa inversamente proporcional a \log_{10} del número de bases (pares de bases para el DNA de doble cadena) que forma la molécula. Operativamente se preparó un gel de agarosa en 50 ml al 1 % esto es: 0.5 g. de agarosa en 50 ml de buffer TE (trizma base, EDTA 0.5 M); al cual se le agregó cuando estaba tibio 3 μ l de bromuro de etidio. Se cargaron 4 pozos, uno por muestra.

El gel se corrió por 30 min. a 75 Volts y posteriormente se observó en el transiluminador FisherBiotech de Fisher Scientific. Ver rubro de resultados para visualizar la imagen.

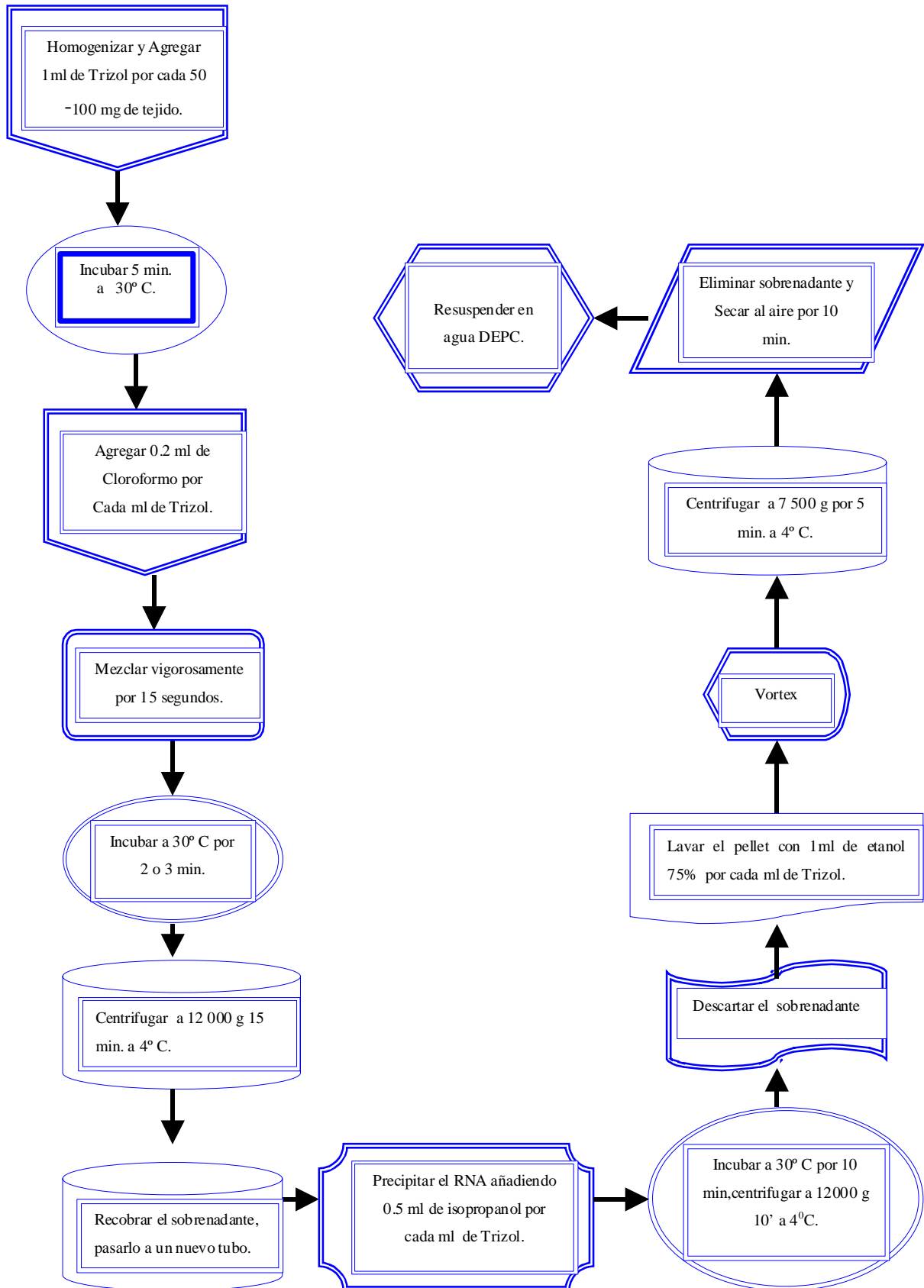


Figura 6.1. Proceso de extracción de RNA total según mediante TRIzol.

5.6.2 Producción de DNAC mediante oligo – dT

La retrotranscripción se realizó a partir del RNA total extraído del ducto deferente de rata, utilizando el kit Superscript First Strand System de Invitrogen (cat, 12371-019). Se agregaron 20 µg de RNA, oligo dT, y se llevó a 96 µl con agua libre de nucleasa (DEPC) como se muestra a continuación:

Retrotranscripción a partir de RNAm (poliA)

RT-PCR	
20 µg de RNAm (poli A)	20 µl
Oligo dT	8 µl
Agua DEPC	68 µl
Volumen final	96 µl

Se incubó por 10 min. a 70°C, y se enfrió en hielo durante 1 min.

Se agregó 56 µl que contienen: 16 µl amortiguador de PCR, 16 µl 25 mM de MgCl₂, 8 µl 10 mM dNTP's (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 16 µl 100 mM DTT. La mezcla se incubó por 5 min. a 42°C. Posteriormente se le agregaron 8 µl de transcriptasa reversa (200 U/µl) y se incubó 1 h. a 42°C. Se inactivó la transcriptasa reversa por 15 min. a 70°C y se colocó en hielo por 1 min.

A continuación se adicionó 8 µl de RNAsa H (Promega Cat. M4281) de 2 U/µl, incubándose por 20 min. a 37°C. Finalmente se almacenó a -80°C.

5.6.3 Amplificación del gen mediante oligonucleótidos específicos.

Para realizar la amplificación del DNAC específico de la 5-NT se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: CD73 (S) ; 5'- **CAC CAA GGT TCA GCA GAT CCG C- 3'** y el oligo antisentido ; 5'- **GTT CAT CAA TGG**

GCG ACC GG -3' los cuales han sido utilizados para amplificar el templado obtenido mediante RT-PCR de células del epitelio intestinal. Para tal efecto se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional utilizando a la *Taq* DNA polimerasa como se muestra en la figura 6.2.

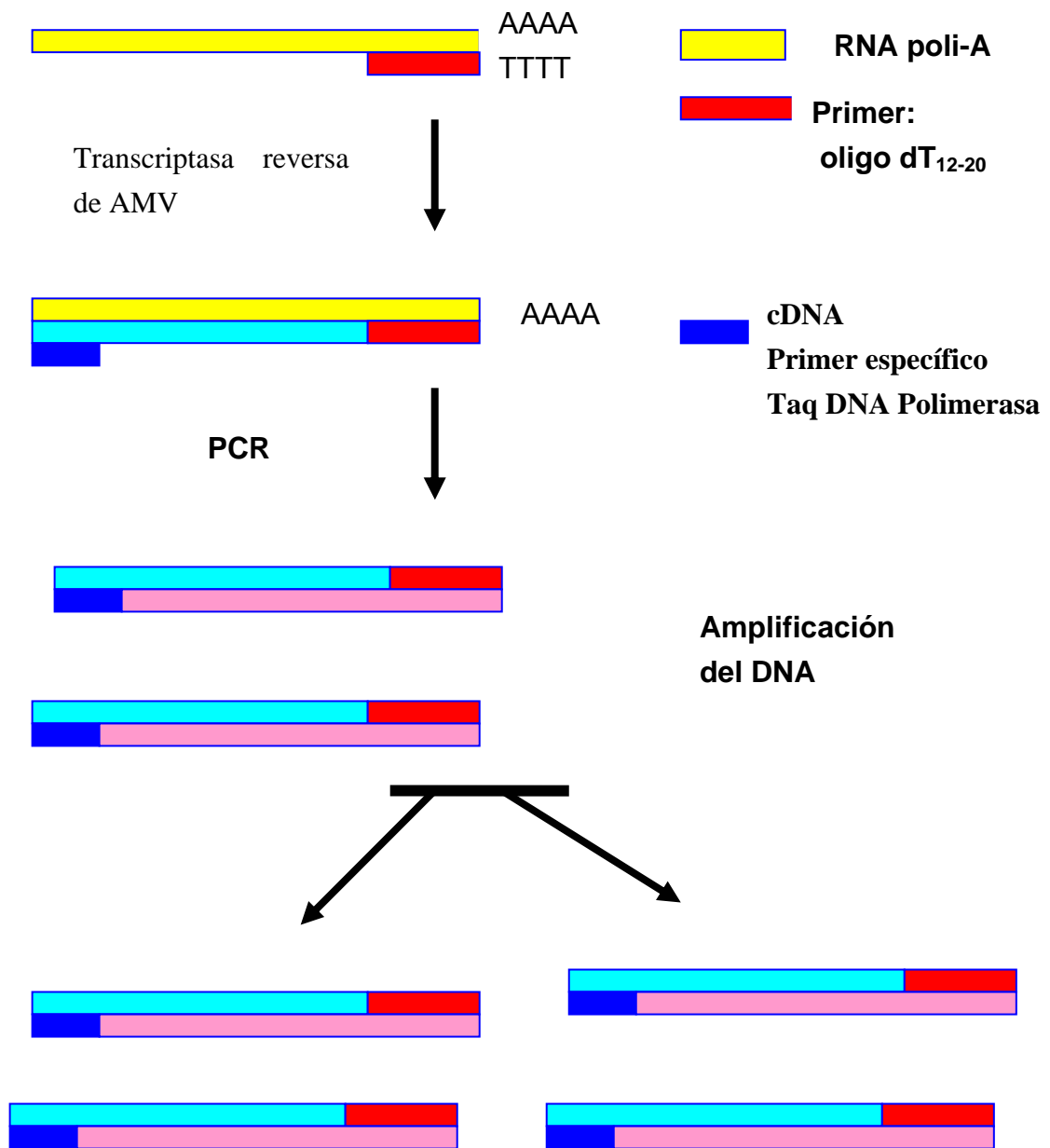


Figura 6.2. Procedimiento de amplificación "oligo específico".
 La *Taq* DNA polimerasa tiene la particularidad de añadir al extremo 3' del producto de PCR una adenosina.

5.6.4 Condiciones de PCR.

Los oligonucleótidos en sentido (S) 5'-CACCAAGGTTTCAGCAGATCCGC- 3' y el oligonucleótido antisentido (A) 5'-GTTTCATCAATGGGCGACCGG -3', se rehidrataron con 100 μ l de agua estéril cada uno formando de esta manera la solución "madre" cuya concentración fue de 100 μ M, ésta se diluyó 1:10 (2 μ l + 18 μ l) para la solución de trabajo [10 μ M], la solución "madre" se almacenó a - 20°C. Al DNAc obtenido mediante RT- PCR se le determinó su concentración y pureza por medio de espectrofotometría a 260/280 nm, colocándose en una cuveta 300 μ l de agua, y 5 μ l de muestra procediendo a medir sus absorbancias, obteniéndose los resultados que a continuación se presentan:

Tubo	260nm	280nm	Relación 260/280	Concentración
1	0.187	0.110	1.7	0.5 mg/ml
2	0.190	0.115	1.65	0.57 mg/ml

En seguida se realizó una dilución 1:2 del contenido del tubo #1 para llevar a cabo la técnica de PCR (Invitrogen Cat. No. 10198-018) de acuerdo con el siguiente esquema.

	R1	R2	Control +	Control -
Agua	29 μ l	29 μ l	30 μ l	31 μ l
Buffer 10X	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
dNTPs 2.5 mM.	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l
cDNA	2 μ l	2 μ l	1 μ l	-
Oligos (s)	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
Oligos (a)	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
<i>Taq.</i> Polimerasa	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l

Volumen = 50 μ l

Una vez que todos los componentes de la mezcla de reacción se adicionaron al tubo eppendorf de PCR se colocaron en el termociclador bajo el siguiente esquema de amplificación (Figura 6.4): 1 calentamiento previo a 94⁰C durante 3 min, 2 desnaturalización del DNA a 94⁰C por 1 min, 3 hibridación de oligonucleótidos a 60⁰C por 2 min, 4 extensión a 72⁰C por 4 min, (los pasos 2, 3, 4 se repiten durante 35 ciclos) y finalmente una extensión a 72⁰C por 4 min.

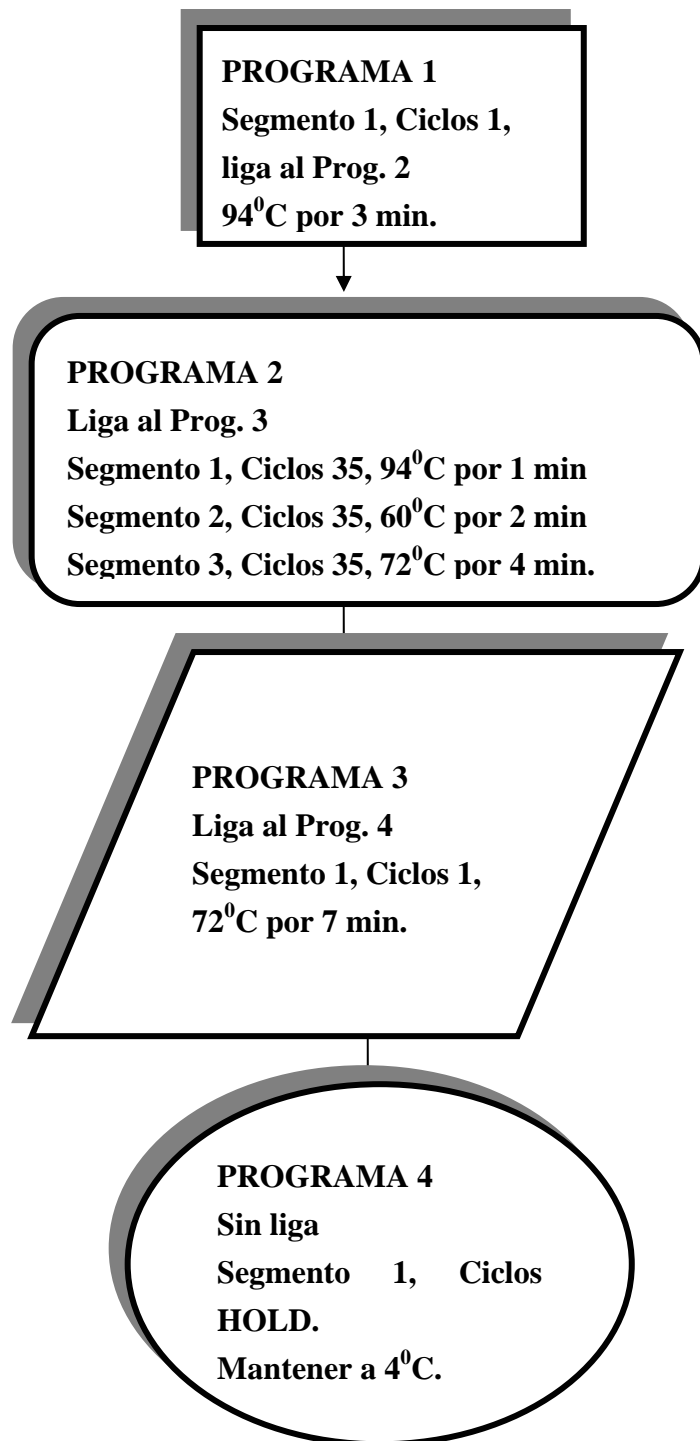


Figura 6.3 Programa para la amplificación de eNT de ducto deferente.

Al término de la amplificación mediante PCR, se practicó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en solución buffer TE y 5 µl de bromuro de etidio como revelador, utilizando 15 µl de cada muestra y 5 µl de buffer de carga, se realizó su corrimiento a 100 Volts durante 45 min. utilizando para ello una fuente de poder. El gel se observó en un transiluminador FisherBiotech de Fisher Scientific para permitir la visualización del producto de amplificación (amplicón).

5.6.5 Purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa y Clonación en TOPO – TA.

Después de visualizar al producto de amplificación (banda) se procedió a recuperar y purificar el DNA por centrifugación, utilizando para ello el sistema de purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa (Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System – Promega, Cat. A9282) realizando los pasos que a continuación se describen:

Disolución del gel.

1. Posterior a la electroforesis se cortó la banda con el DNA en el gel y fué colocado en un tubo eppendorf de 1.5 ml.
2. Agregar 10 µl de la solución de unión a la membrana por cada 10 mg del gel. Se aplicó vortex y se incubó a 50 – 65⁰C hasta disolución del gel.

Unión del DNA; se insertó la minicolumna SV dentro del tubo colector. En seguida se transfirió la mezcla disuelta del gel a la minicolumna, incubandose un min. a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación se centrifugó a 10,000 g por 1 min, y el líquido se eliminó del tubo colector. Lavado; se agregó 700 µl de la solución de lavado de membrana, se centrifugó a 8,000 rpm por 1

min, el líquido se eliminó del tubo colector, repitiéndose el paso anterior con 500 μ l de la solución de lavado, y centrifugación a 8,000 rpm por 5 min.

Elusión; se transfirió la minicolumna a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml, se agregó 50 μ l de agua estéril libre de nucleasas a la minicolumna incubándose a temperatura ambiente por un min. Se centrifugó a 8,000 rpm por 1 min, eliminando la minicolumna y el DNA fue almacenado a -20°C .

Clonación:

La inserción del producto de PCR al vector pCR2.1-TOPO se realizó mediante la mezcla de: 3 μ l del producto de PCR, 1 μ l de la solución de sales ($\text{NaCl}+\text{MgCl}_2$), 1 μ l de agua estéril y 1 μ l del vector TOPO. Estos se mezclaron e incubaron durante 5 min a temperatura ambiente ($22-23^{\circ}\text{C}$), transcurrido el tiempo los tubos se colocaron sobre hielo y se procedió a realizar la transformación celular.

Es importante tener las células químicamente competentes de *Escherichia coli* "One Shot" descongeladas, ya que a un vial de las mismas se le agregó 2 μ l de la reacción de clonación en TOPO-TA y se mezclaron suavemente, incubando la mezcla sobre hielo por 5 – 30 min, en seguida se realizó un pulso térmico de 30 s a 42°C , se regresaron los tubos inmediatamente al hielo, se agregó 250 μ l del medio SOC y se incubaron en agitación continua (200 rpm) a 37°C por 1h, transcurrido el tiempo se sembraron 10-50 μ l en las placas de medio LB con 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina y se incubó de 18 -24 h a 37°C . Finalmente al día siguiente se seleccionaron las colonias para sus análisis.

5.6.6 Características del vector.

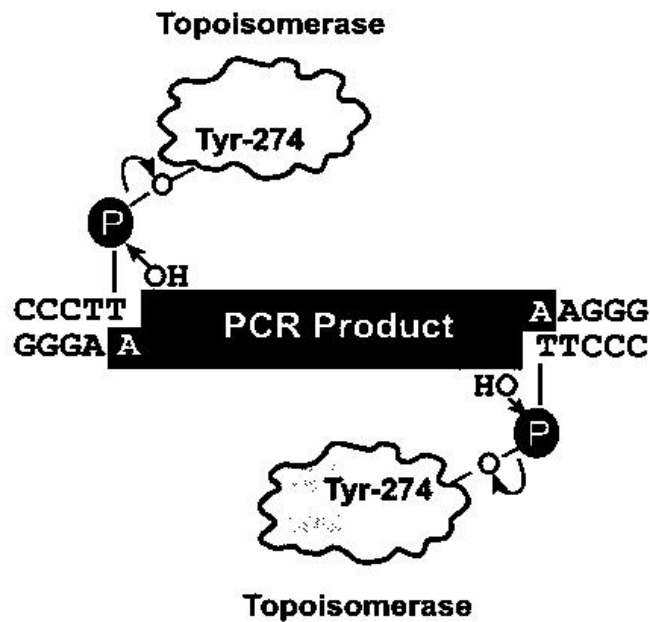


Figura 6.4 Esquema de la estrategia TOPO-TA. obsérvese el enlace fosfodiéster entre T y Tyr 274. Tomado de Invitrogen Manual Versión M.

5.6.7 Análisis de las clonas positivas.

Se seleccionaron 5–10 colonias etiquetándolas, se resuspendieron en 10 ml de caldo LB con 50 µg/ml de kanamicina cada una y se incubaron 18-24 hs a 37°C. Se realizó una PCR utilizando los oligonucleótidos anteriormente citados. El aislamiento del DNA plasmídico se realizó mediante lisis alcalina de la siguiente manera:

Del desarrollo bacteriano en el medio de LB se tomaron 5 ml, y se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min. La pastilla se pasó a

un tubo eppendorf, a la cual se le agregaron 100 μ l de solución GTE (Glucosa, Tris pH 8, EDTA), y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 200 μ l de NaOH/SDS y se puso a incubar sobre hielo por 5 min a 4^oC. En seguida se agregaron 150 ml de acetato de potasio pH 4.8 agitandose en "vortex" por 2 s. e incubando sobre hielo por 5 min, se centrifugó 3 min para separar a los plasmados, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se adicionó 0.8 ml de etanol incubando 2 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 4^oC para recuperar al plasmido. Se lavó con etanol al 75% dos o tres veces, y se dejó secar al aire. Se resuspendió en 30 μ l de agua y se congeló a -20^oC para su posterior análisis de plasmido por restricción con *EcoR1* y/o secuenciación.

6. Resultados.

A continuación se presentan los resultados obtenidos durante el presente trabajo de extracción y purificación de la eNT a partir del ducto deferente de la rata, así como la obtención de un amplicón mediante el uso de oligonucleótidos específicos para eNT.

6.1 Extracción y purificación de e-NT.

Como se ha mencionado, la solubilización de la enzima del ducto deferente se realizó inicialmente mediante un procedimiento mecánico utilizando para ello al mortero con pistilo y/o el potter vidrio-vidrio y el buffer 1 (Tris 20 mM pH 7.4). En seguida los homogenizados se resuspendieron secuencialmente en presencia de detergentes como: Triton X-100 al 1% seguido de tratamiento con Triton X-100 al 5% y desoxicolato al 2%. Estos tratamientos tienen como finalidad separar secuencialmente la eNT.

A las muestras obtenidas durante el procedimiento de extracción descrito anteriormente (Figura 5.2) se les midió actividad enzimática (figura 7.1) de AMPasa por el método de Fiske-Subbarow, obteniendo el siguiente resultado (en $\mu\text{mol de Pi min}^{-1}\text{mg}^{-1}$): S1 (10.4 ± 1.5); S2 (11 ± 0.5); H2 (1.8 ± 0.05); S3 (2 ± 0.04). La purificación de la eNT se continuó utilizando la fracción S2, mediante su interacción con concanavalina A-Sepharose, descrita a continuación.

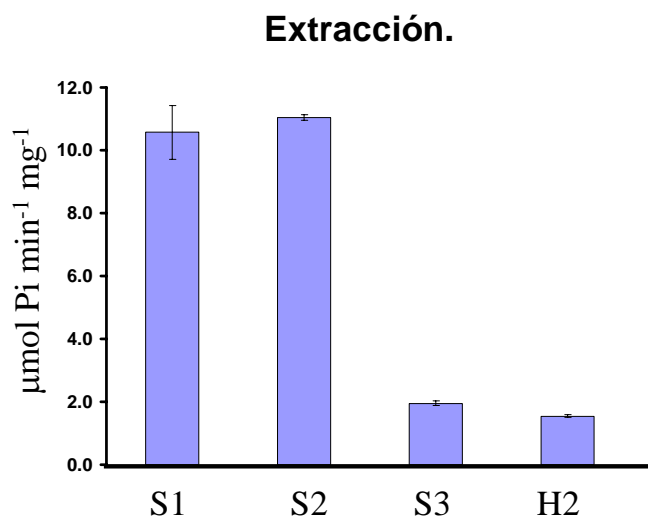


Figura 7.1 Actividad enzimática de eNT en las fracciones solubilizadas del homogenado de los ductos deferentes. La actividad e-NT se valoró con 1mM de AMP como sustrato y cuantificado el Pi. Se representa el error del ensayo por triplicado. Para detalles ver sección de métodos.

6.1.1 Interacción de S2 con Concanavalina A-Sepharose

(Con-A-Sepharose).

La figura 7.2 presenta el perfil de elusión de las proteínas presentes en S2, el cual se descongeló a temperatura ambiente y se mezcló con 15 ml de Con-A-Sepharose previamente lavada con buffer TST (Tris 20mM pH 7.4, NaCl 400 mM, 0.1 % TX-100). La mezcla se dejó toda la noche en agitación orbital continua a 4⁰C, posteriormente se empacó en una columna cromatográfica de 25 cm de largo por 1 cm de diámetro. Para eliminar las proteínas débilmente unidas a la matriz, la columna fue lavada con 100 ml de buffer TST, mientras que las proteínas fuertemente unidas a la resina a través de manosas se eluyeron con 50 ml de metil- α -D-manopiranosido 0.4 M en buffer TST, a una

velocidad de flujo de 1.5 ml/5 min. Se colectaron 54 fracciones de 1.5 ml cada una, a las que se les determinó su actividad enzimática (AMPasa) por el método de Fiske-Subbarow, congelando a -20 °C las fracciones de mayor actividad enzimática ($\geq 700 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ml}^{-1}$). Posteriormente estas fracciones se descongelaron, mezclaron e interaccionaron con AMP-Separeose como se describe en el siguiente apartado.

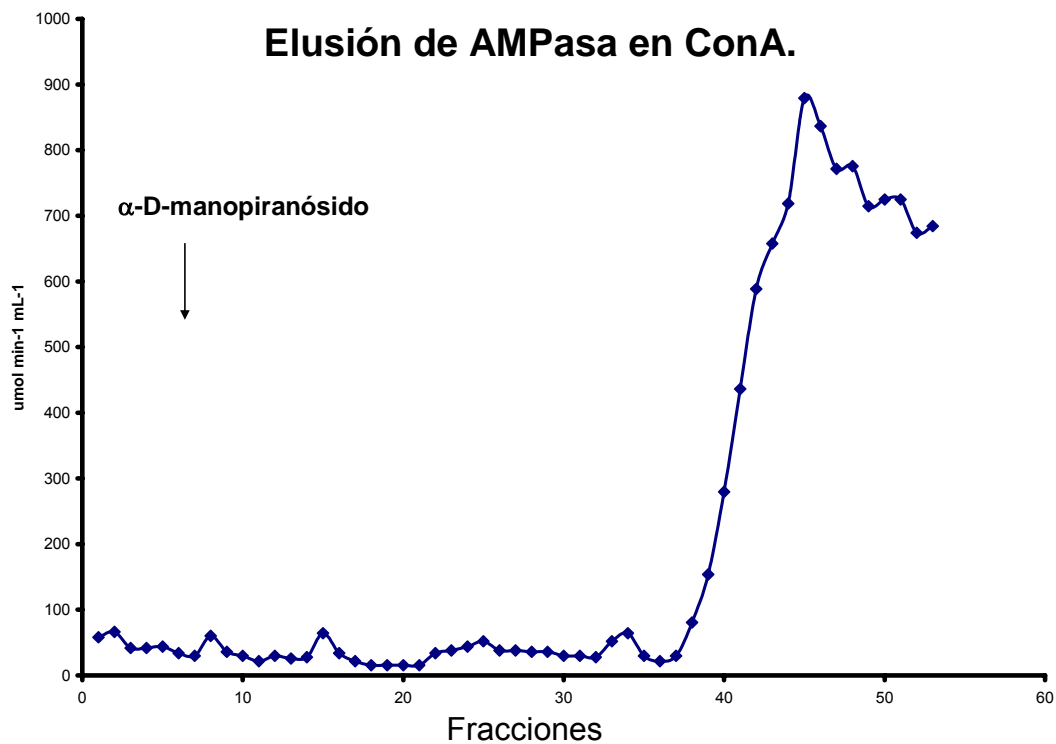


Figura 7.2 Perfil de elución de la actividad AMPasa presente en S2 interaccionada con Con-A Sepharose. La flecha indica el momento de adición del α -D-manopiranosido que estuvo presente hasta el final de la cromatografía.

6.1.2 Interacción con AMP–Agarose.

La figura 7.3 muestra la elución de la eNT de la columna de AMP-Sepharose con un solo máximo de actividad. Para la interacción con AMP-Sepharose, se mezclaron las fracciones con mayor actividad AMPasa provenientes de la elución anterior, (fracciones 45, 46, 47, 48) obteniendo un volumen de 6 ml con una actividad promedio de $800 \mu\text{moles de Pi minuto}^{-1}\text{ml}^{-1}$ y otra mezcla con las fracciones 44, 49, 50 y 51, también de 6 ml con una actividad promedio de $700 \mu\text{moles de Pi minuto}^{-1}\text{ml}^{-1}$. La mezcla de proteínas con la más alta actividad AMPasa se interaccionó con 5 ml de AMP-Agarose previamente equilibrada con 50 ml de buffer TST, manteniéndose en agitación orbital continua toda la noche a 4°C . Para eliminar proteínas unidas débilmente a la matriz de la columna, ésta se lavó con unos 50 ml de buffer TST y se eluyó con 25 ml de AMP 10 mM en buffer TST, a un flujo de 0.1 ml / min. Se colectaron 22 fracciones de 1 ml y se les determinó su actividad AMPasa (Figura 7.3). Como se puede apreciar en el cromatograma la fracción 4 presenta una actividad AMPasa de alrededor de los $200 \text{ nmol Pi} \cdot \text{h}^{-1}$, mientras que la fracción 5 presenta una actividad cercana a $80 \text{ nmol Pi} \cdot \text{h}^{-1}$, por lo que a partir de éstas fracciones y con la finalidad de eliminar sales y la adenosina, se pasaron las fracciones a través de una columna con 10 ml de Sephadex G-25 equilibrada con NaCl 0.2 M en buffer Tris 20 mM, pH 7.4, se colectaron nuevamente 22 fracciones a las que se les valoró actividad AMPasa a una velocidad de flujo de 1.0 ml / 3 min, obteniendo los resultados que se muestran en la figura 7.4. Nuevamente, la actividad eluyó en un solo pico y el Pi se retrasó.

Elusión de AMPasa después de su interacción con AMP-Agarose .

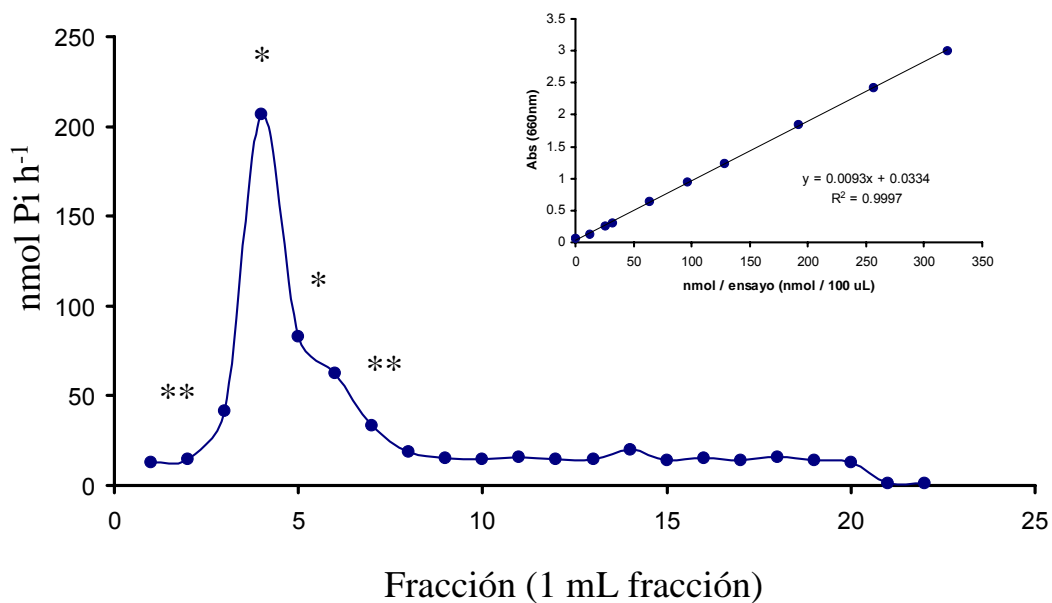


Figura 7.3 Actividad AMPasa de las fracciones eluidas del AMP-Agarose. El asterisco (*) indica las fracciones que se mezclaron para posteriormente desalarlas. El recuadro indica la curva de calibración para la cuantificación del Pi.

Así pues, hasta el momento se cuenta con una proteína que presenta una actividad AMPasa con $580 \text{ nmol Pi} \cdot \text{h}^{-1}$, la cual se congeló a -20°C , para continuar con su caracterización.

Desalado (Sephadex G-25)

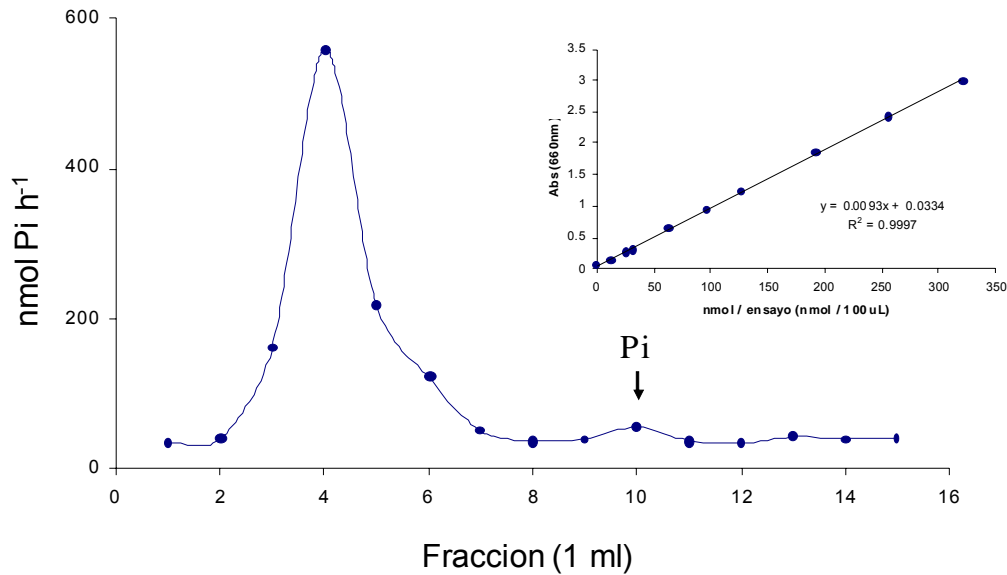


Figura 7.4. Actividad AMPasa de las fracciones correspondientes al volumen muerto y fracciones retardadas en Sephadex G-25. Pi indica la elusión del mismo, el recuadro muestra la curva de calibración para la cuantificación de Pi.

6.1.3 Caracterización de eNT.

A partir de la fracción obtenida en el desalado anteriormente mencionado (Figura 7.4) se procedió a realizar una serie de ensayos que permiten caracterizar la proteína purificada durante el proceso, la cual como se menciona presenta actividad AMPasa. Para definir el tiempo de ensayo de actividad se determinó la linealidad de acuerdo a la metodología citada en el rubro de materiales y métodos (ver figura 7.5).

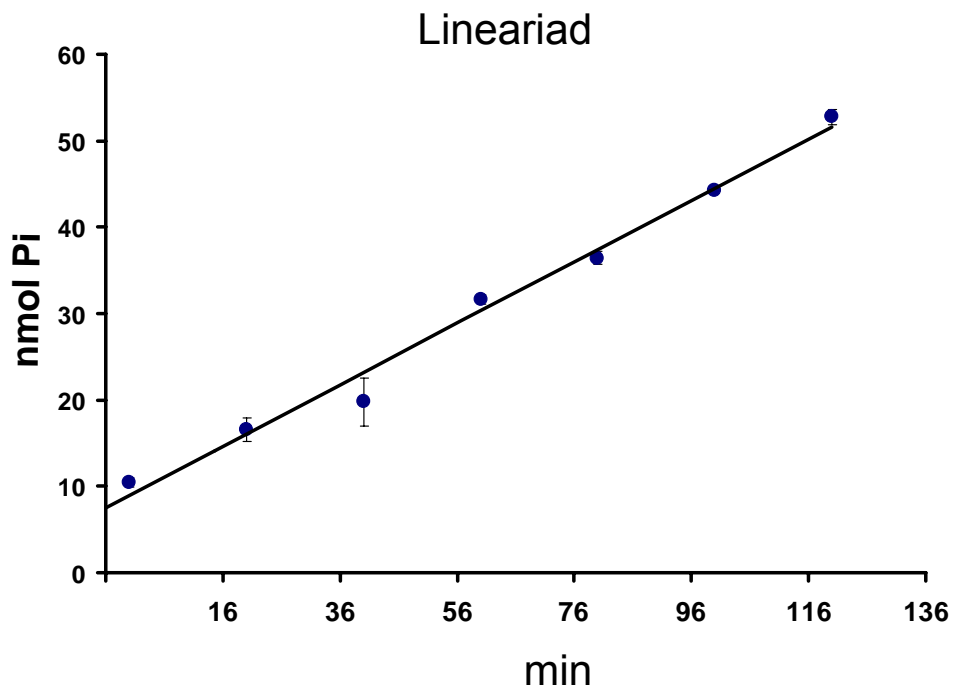


Figura 7.5 Producción de Pi en función del tiempo. Se utilizó 1 mM de AMP como sustrato a 37°C durante el tiempo indicado. Ver métodos para más detalles.

Como se aprecia, la enzima presenta una cinética lineal de primer orden, cuando se tiene una concentración de AMP de 1 mM, es decir el reactivo limitante no es la concentración de sustrato hasta los 136 min. Esto permitió asegurar que en los ensayos subsiguientes, de 1 h de incubación, el sustrato no se agotó, los tiempos de incubación posteriores se ajustaron a 1 h y muestreando cada 10 min.

A continuación se realizó el ensayo de inhibición específica para eNT utilizando AMP 1 mM como sustrato en presencia de α , β -metilen-adenosina-5'-difosfato (α , β -MADP) a una concentración de 1 mM, obteniéndose una completa inhibición en la hidrólisis del AMP, como se puede apreciar en la figura 7.6.

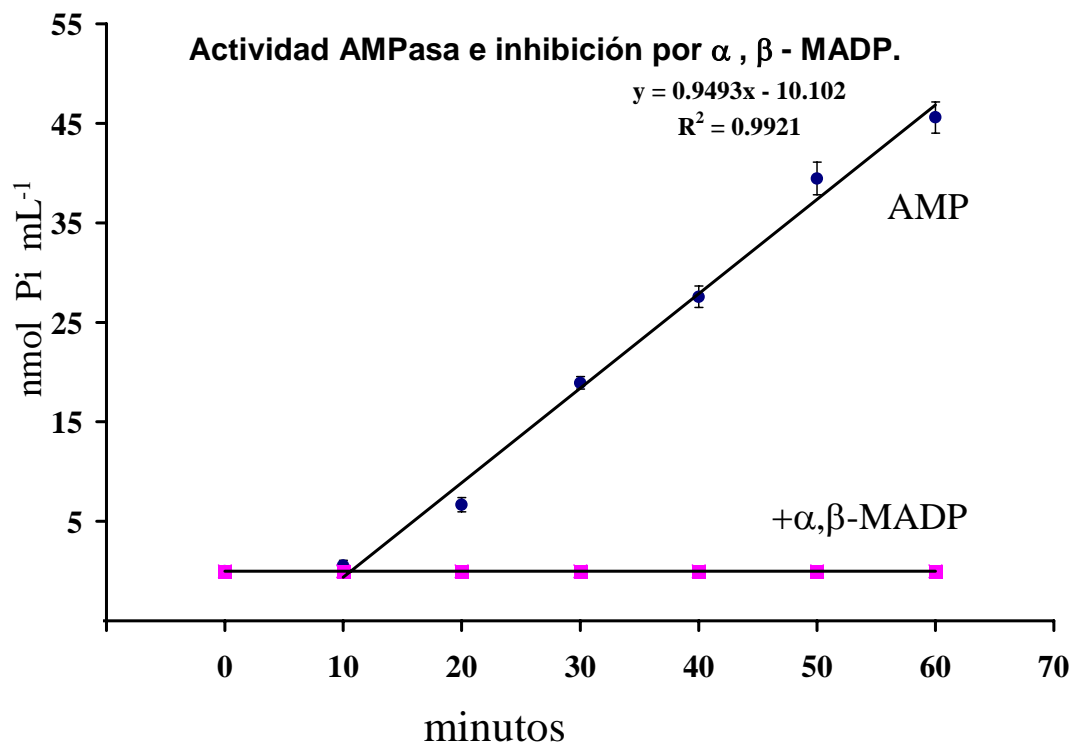


Figura 7.6 Actividad AMPasa e inhibición por α , β -MADP.

Este resultado confirma que se trata de eNT y no de otras fosfoesterasas, puesto que el α , β -MADP, es un inhibidor específico para eNT.

En seguida, para continuar con la caracterización, se incubó a la enzima con 1 mM de cada uno de los siguientes sustratos: AMP, p-nitrofenilfosfato (pNPP), β -glicerolfosfato (β -GP) y una mezcla de AMP más β -glicerolfosfato, obteniendo los resultados que se muestran en la figura 7.7.

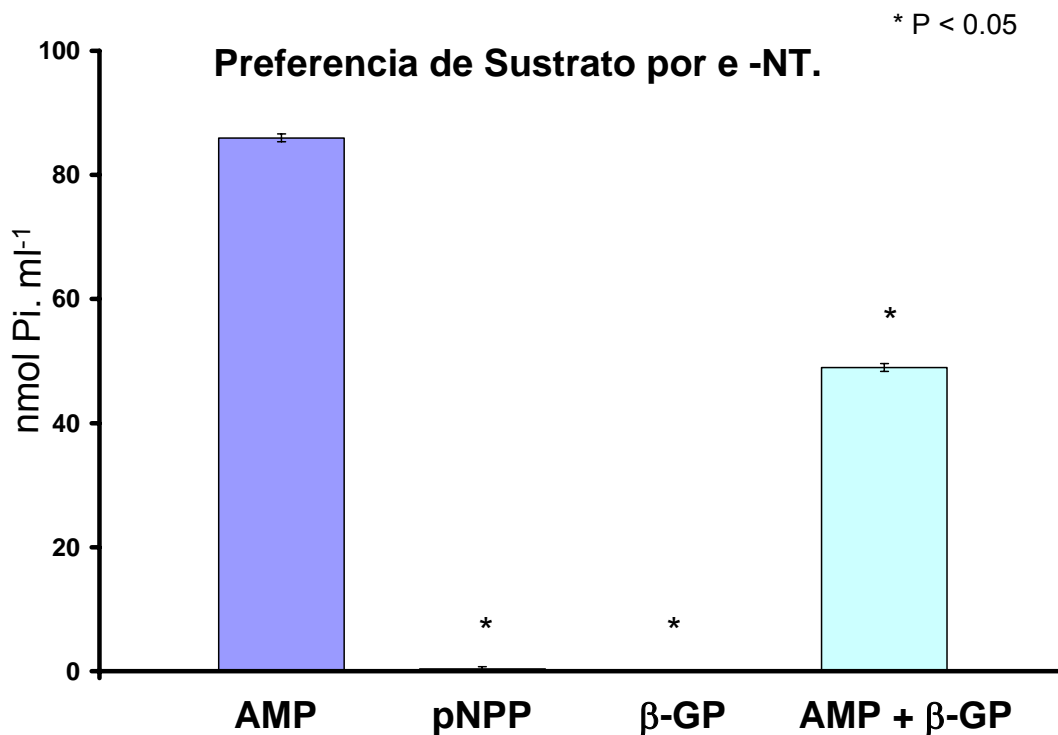


Figura 7.7 Preferencia de sustrato por e-NT. Se presenta la producción de Pi en los 60 min de reacción para cada sustrato: AMP; adenosina 5'-monofosfato, pNPP; para- nitrofenilfosfato, β-GP; beta glicerol fosfato. El asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (AMP).

Como se ha descrito previamente, la eNT es capaz de hidrolizar AMP pero no pNPP ni b-GP, la figura 7.7 muestra que esta característica se cumple en la enzima purificada a partir del ducto deferente de la rata y que el b-GP aunque no hidrolizado, es capaz de inhibir la hidrólisis del AMP, ello puede ser debido a la ocupación del sitio catalítico de la enzima.

Además, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (figura 7.8), revelándose mediante el método de tinción de plata amoniacal, lo que permitió obtener una banda de peso molecular aproximado de 66 KDa. que se encuentra dentro del rango de la

eNT, y la baja intensidad de la banda indica la baja concentración de proteína debida al bajo rendimiento en la purificación.

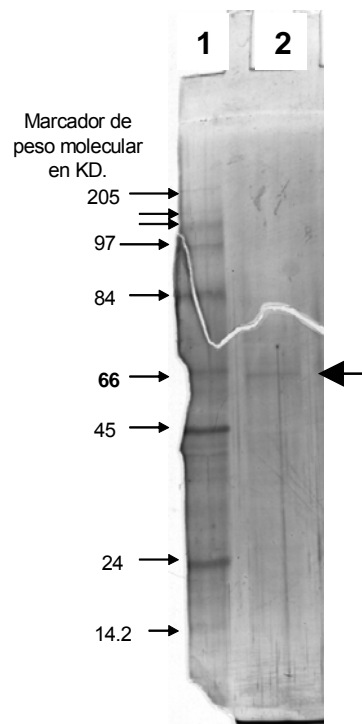


Figura 7.8 Tinción de plata amoniacal para e-NT. Carril 1, 10 μ L de marcador: miosina 205, fosforilasa b 97, fosfofructocinasa 84, Albúmina de suero bovino 66, ovoalbúmina 45, tripsinógeno 24 y α -lactoalbumina bovina 14.2 KDa. Carril 2, 10 μ l de la enzima purificada. La flecha indica la banda proxima a 66 kDa obtenida.

6.1.4 Metal asociado a la eNT

Las muestras con actividad AMPasa de S2, eluido de Con-A, fracciones lavadas de AMP-Agarose y enzima purificada se analizaron por espectroscopia óptica de emisión inductivamente acoplada a plasma dos metales divalentes, Zn y Cd (Tabla 6). Los datos obtenidos confirman que la enzima eNT del ducto deferente es una enzima con Zn como cofactor asociado a ella. Este dato debería contemplarse para complementar con Zn cada paso de purificación.

Fracción	ng/mL	
	Zn	Cd
S2	21	ND
Con-A (eluido)	84	ND
Lavado (AMP-Agarose)	0	ND
eNT (purificada)	15.3	ND

Tabla 6. Concentración de Zinc y Cadmio en la ecto-nucleotidasa purificada, así como en sus estadios previos de purificación. La metodología se describe en la sección de materiales y métodos.

6.2 Extracción del RNA total.

Por otro lado, también se realizaron ensayos utilizando algunas de las herramientas más frecuentes en la biología molecular, utilizando TRizol (Invitrogen) se extrajo el RNA total a partir del ducto deferente de la rata, obteniendo los resultados que se pueden visualizar en la figura 7.9. Donde se observan las bandas de RNA correspondientes a 18S, 16S y 5S

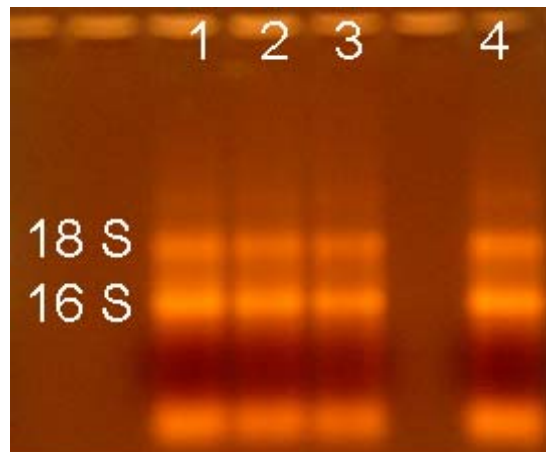


Figura 7.9 Electroforesis del RNA total intacto, obtenido con TRIzol a partir de tejido del ducto deferente de la rata. 28S y 18S hacen referencia a las especies ribosomales de 28 y 18 Svedverg. Carril 1-3; 5 μ l de muestra y 4 con 10 μ l.

El RNA obtenido del ducto se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm, dado que una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 40 μ g/ml de RNA, el cálculo de la concentración de RNA fue como sigue: 0.100 de absorbancia, por 40, por el factor de dilución 305/5 igual a 270 μ g/ml.

6.2.1 Obtención de DNAc y amplificación por PCR mediante el uso de oligonucleotidos específicos para eNT.

Para producir el DNAc a partir del RNAm (Poli-A) por retrotranscripción se utilizó el kit Superscript First Strand System de BRL, para lo cual se realizó una dilución 1:10, con agua estéril, del RNA obtenido con TRIzol, descrito anteriormente, se siguieron los lineamientos del protocolo propuestos por el fabricante, descritos anteriormente. Una vez obtenido el DNAc se realizó una PCR “oligo-específica” bajo las condiciones citadas en el rubro metodología, visualizando al producto de PCR en el transiluminador FisherBiotech de Fisher Scientific. El amplicón tiene un tamaño aproximado de 1200 pb, que concuerda con el tamaño esperado, se puede observar en la figura 7.10.

El amplicón se purificó del gel de agarosa mediante el sistema Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System – Promega, Cat. A9282, almacenando el producto de PCR (amplicón) a -20°C.

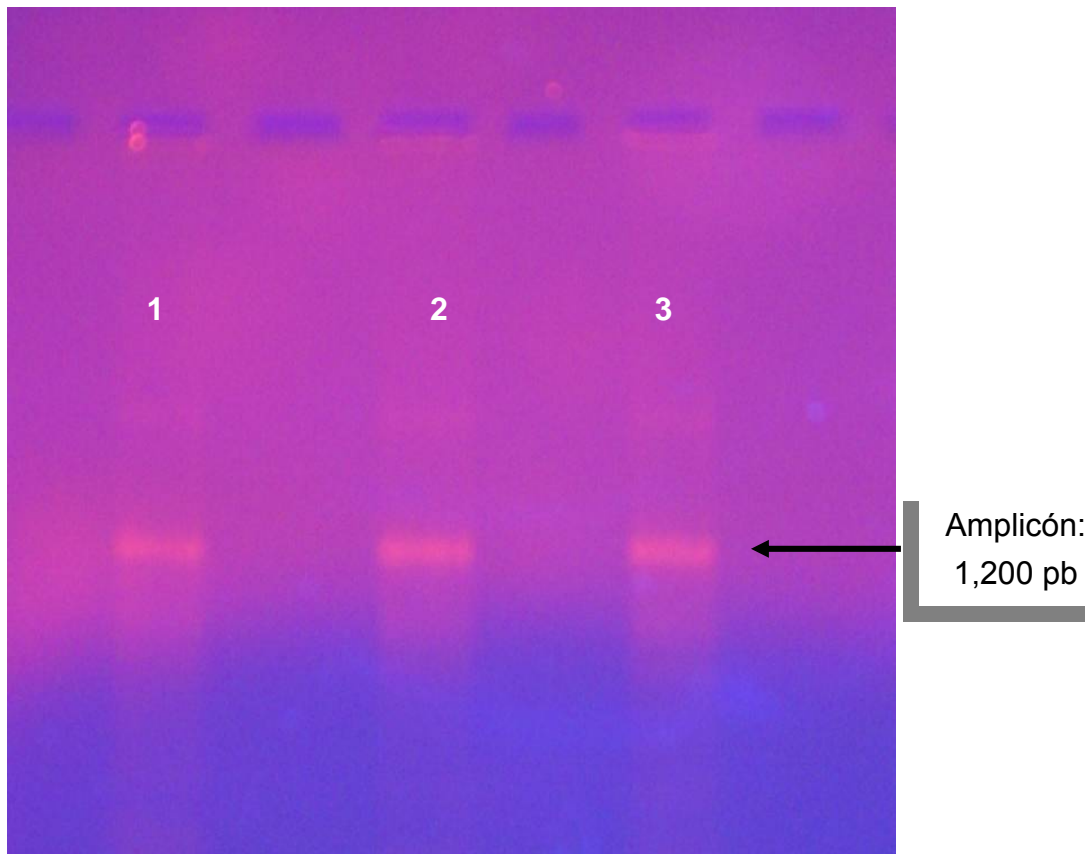


Figura 7.10. Producto de amplificación (amplicón) por PCR oligo-específico. Carril 1, 2 y 3 misma muestra de 15 μ l, en agarosa al 1 % en buffer TE con 5 μ l de bromuro de etidio, a 100 Volts por 45 min.

6.2.2 Clonacion en TOPO-TA.

Después de realizar el procedimiento de purificación de las bandas teñidas con bromuro de etidio y visualizadas en el transiluminador se procedió a insertar el amplicón en el vector pCR 2.1-TOPO para generar el plásmido pCR2.1-e-NT siguiendo el protocolo citado en la sección de métodos, transformando la cepa competente de *E. coli* DH5 α y permitiendo su desarrollo

bacteriano óptimo en el medio de cultivo LB con 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina a 37 $^{\circ}\text{C}$ en agitación continua durante 1 h. En seguida se inocularon 10-50 μl en placas con medio LB kanamicina incubándose a 37 $^{\circ}\text{C}$ de 18-24 h, obteniendo el desarrollo bacteriano que se presenta en la figura 7.11, seleccionando colonias únicas para evitar contaminación con colonias no transformadas creciendo a expensas de las transformadas, siendo aquellas que se enmarcan en la figura 7.11.

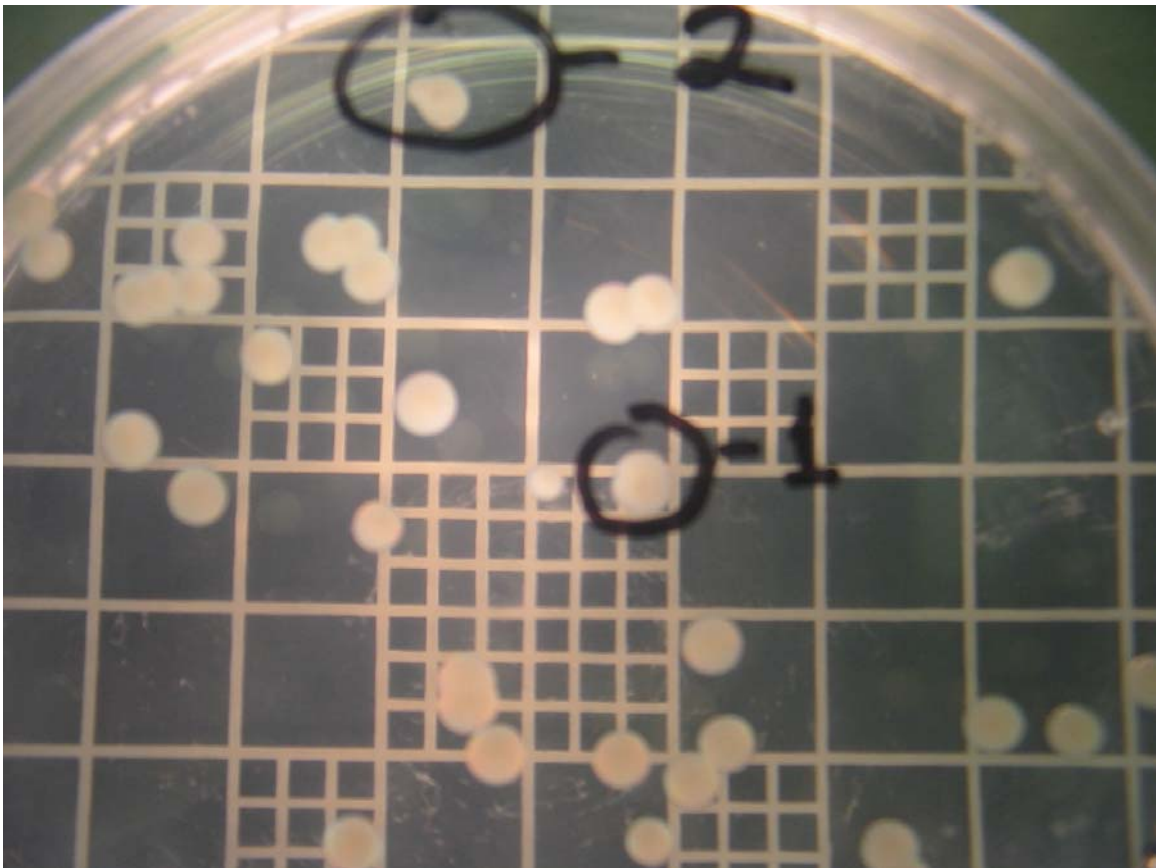


Figura 7.11 Morfología colonial de *E.coli* transformada con el plásmido pCR2.1-eNT, en medio LB/50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina.

En seguida se seleccionaron tres colonias y se hicieron crecer en caldo LB 50 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina para la extracción del plásmido pCR2.1e-NT mediante lisis alcalina. El plásmido recuperado se sometió a restricción con *EcoR1*, recuperando al vector pCR 2.1TOPO de 3.9 kb y al inserto (amplicón) de 1.2 kb, como se muestra en la figura 7.12.

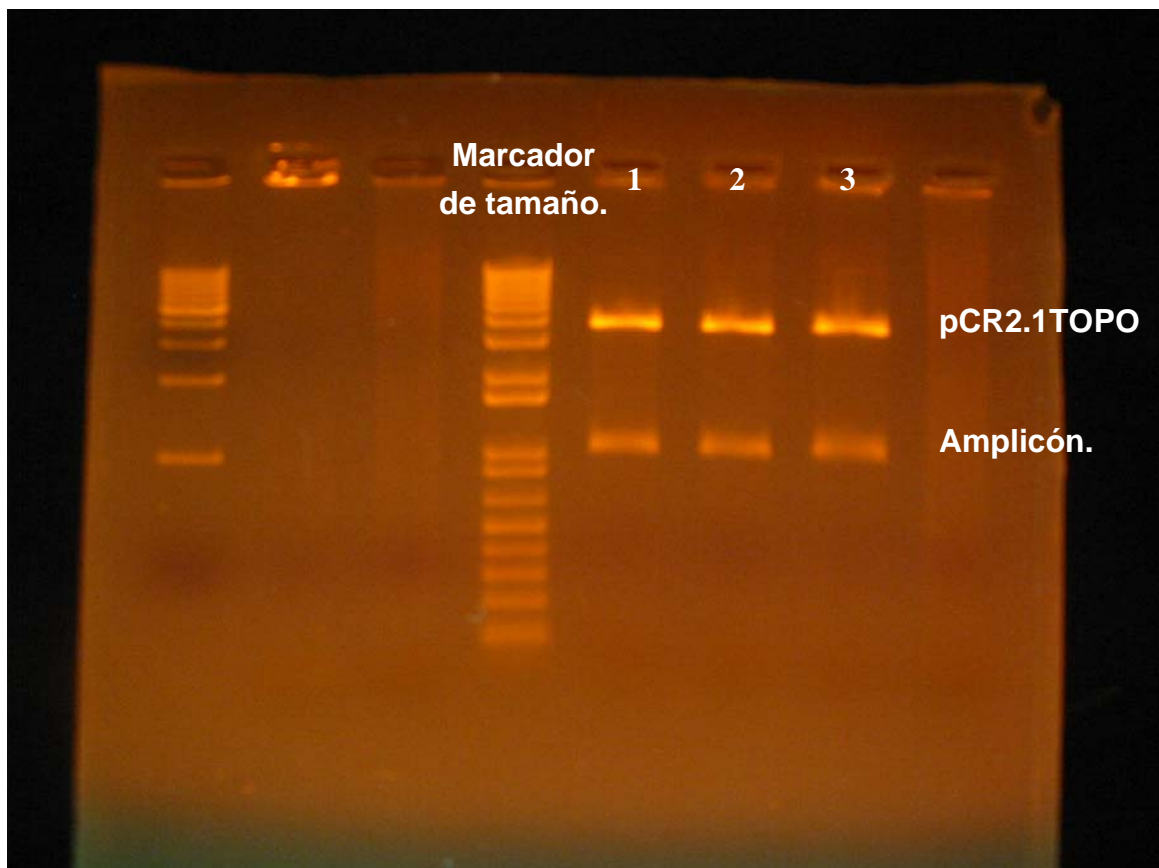


Figura 7.12 Restricción del plásmido pCR2.1-eNT con *EcoR1*, mostrando el inserto de tamaño aproximado a 1200 pb, carril 1, 2, 3 vector TOPO e insertos de tres colonias distintas.

7. Conclusiones.

1. La fracción correspondiente al sobrenadante 2 (S2) durante el proceso de extracción fue la que presentó mayor actividad AMPasa. Por lo que se seleccionó dicha fracción para continuar con los siguientes ensayos.
2. Después de purificar la proteína mediante cromatografía de afinidad pasandola secuencialmente por Con-A-Sepharose y AMP-Agarose seguida de un proceso de desalting, se purificó una proteína con actividad AMPasa de alrededor de 600 nmoles de Pi h⁻¹.
3. La enzima anterior fue incubada en presencia de los sustratos; AMP, p-nitrofenilfosfato, β-glicerolfosfato y el inhibidor α, β metilen adenosina 5' difosfato, lo cual permitió tener más argumentos que indican que la proteína enzimática en cuestión, corresponde a e-NT extraída y purificada a partir del ducto deferente de la rata, pues el sustrato preferido es AMP, es inhibida por α, β-MADP y no hidroliza ni al p-NPP ni al β-GP.
4. Además, mediante la purificación por electroforesis de proteínas SDS-PAGE, se detecta una proteína cuyo peso molecular aproximado es de 66 KDa, lo cual corresponde al rango de peso molecular de eNT.
5. Puede observarse que el Cd no aparece como elemento traza en todas las preparaciones. El Zn aparece claramente en la fracción de enzima purificada, por lo que podría argumentarse que es el metal asociado a la eNT de ducto deferente.

En la tabla 6, puede observarse que la naturaleza del metal asociado a la

enzima corresponde al Zn, lo cual indica que la nucleotidasa del ducto deferente comparte las características cinéticas y de inhibición así como la de la eNT descrita para otros tejidos en vertebrados superiores (Zimmerann, Martínez-Martínez). Los datos cristalográficos que se tienen son para la ecto-nucleotidasa de *E. coli*, (gen *ushA*, gi 43276), en la cual la relación Zn / monómero es igual a 2. Al alinear la secuencia de aminoácidos de la e-NT de rata presente en ExPASy (P21588) contra las demás nucleotidasas en la misma base de datos obtuvimos una similitud significativa (valor esperado de 2×10^{-33}) con la e-NT de *E. coli* (Q8FBB3), para la cual se ha realizado la cristalografía de rayos X (Knoefel y Sträter 2001), atendiendo a esta similitud y a la descripción de la naturaleza metálica del Zinc como metal nativo de músculo esquelético de ratón (Martínez-Martínez y col 1997), proponemos que la eNT de ducto deferente comparte las características estructurales anteriormente descritas para otros tejidos y la naturaleza metálica para la familia de las nucleotidasas.

Por otra parte, se logró clonar un amplicón de aproximadamente 1200 pb a partir del RNA extraído del ducto deferente de la rata, el cual se encuentra integrado al vector de clonación pCR 2.1-TOPO, mismo que se ubica en las células transformadas de *E. coli* DH5 α almacenadas a -70 $^{\circ}$ C.

8. Recomendaciones y sugerencias para trabajo futuro.

Por lo que se refiere a los métodos utilizados tanto de extracción y purificación, así como para la extracción del RNA, es importante conocer el manejo de muestras biológicas además de la anatomía de la especie animal con la que se va a iniciar un trabajo y por ende la habilidad para realizar una buena disección. Es necesario también, conocer y aplicar las normas de Bioética que regulan la utilización de animales de experimentación en los laboratorios de investigación NOM-062-ZOO-1999, además de conocer y aplicar la normatividad vigente que regula la disposición de materiales o productos corrosivos, reactivos, explosivos, tóxicos, inflamables y biológicos (CRETIB) utilizados durante el trabajo experimental.

Es recomendable involucrar nuevos estudiantes al equipo de trabajo con la finalidad de crear un “semillero” que permita dar continuidad al proyecto y que este, se vaya fortaleciendo y diversificando de acuerdo a las ideas aportadas por todos los elementos participantes y las necesidades del grupo, dirigidos eventualmente por el coordinador o líder del equipo de trabajo, fue así como este proyecto llegó a su término y se le dará seguimiento para continuar creciendo y aportando un foro en el que las oportunidades son para quienes las adopten.

Así, en este momento, ya se encuentran personas encargadas de dar continuidad a la parte de la clonación presentada en este trabajo, lo cual permitirá la producción de proteína transgénica en organismos procariones o eucariotes, que pudiera ser utilizada en otras investigaciones. Además, se tiene

avances en la producción de anticuerpos policlonales para eNT, así como en el trabajo con los sinaptosomas de cerebro de rata.

Finalmente, los conocimientos y habilidades adquiridos durante la aplicación de las diferentes metodologías utilizadas en el desarrollo del trabajo experimental realizado, podrán utilizarse en la continuidad del mismo así como, para apoyar otras líneas de investigación.

Bibliografía.

Anner B., Moosmayer M. (1975). Rapid Determination of Inorganic Phosphate in Biological Systems by a Highly Sensitive Photometric Method.. *Analytical Biochemistry*, 65, 305-309.

Bailly Y, Schoen SW, Delhaye-Bouchaud N, Kreutzberg GW, Mariani J. (1990). "Synaptic localization of 5'-nucleotidase activity in the cerebellar cortex in adult rats irradiated by X rays after birth". *C R Acad Sci III*, 311:487-93.

Beachman, I.R y Wilson, M.S. (1982). Studies of UDP-sugar hidrolases from *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*.. *Arch. Biochem. Biophys.*, 218, 603-608.

Burns, D.M. y Beacham, I.R. (1986). Identification and sequence analysis of silent gene (*ushA^o*) in *Salmonella typhimurium*. . *J. Mol. Biol.*, 192, 163-175.

Burnstock, G. (1981). Neurotransmitters and trophic factors in the autonomic nervous system.. J. Physiol. London., 313, 301-305.

Camci, M., Fini, C. y Ipata, P.L. (1985). Isolation and kinetic properties of 5'-nucleotidase guinea pig skeletal muscle.. Biochim. Biophys. Acta., 840, 6-12.

Carter, S.G. y Tipton, C.L (1986). Purification and characterization of 5'-nucleotidase from Zea mays microsomes. Phytochemistry, 25, 33-37.

Chong-Maw, C. y Kristopeit, S.M. (1981). Metabolism of cytokinin.. Plant Physiol., 67, 494-498.

Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.. Anal. Biochem., 162, 156-159.

Codogno, P., Doyonnette-Moyne, M.A., Aubery, M., Dieckhoff, J., Lietzke, R. y Mannhertz, H.G. (1988). Polyclonal and monoclonal antibodies against chicken gizzard 5'-nucleotidase inhibit the sprouting process of chicken embryonic fibroblast on laminin substratum.. Exp. Cell Res., 174, 344-354.

Cunha, R.A., Brendel P., Zimmermann H. y Ribeiro J.A. (2000). Immunologically Distinct Isoforms of Ecto-5'-Nucleotidase in Nerve Terminals of Different Areas of the Rat Hippocampus. J. Neurochemistry, 74(1), 334-338.

Darvish, A. y Metting, P.J. (1993). Purification and regulation of AMP-specific cytosolic 5'-nucleotidase from dog heart.. Am. J. Physiol., 264, 1528-1534.

Dieckhoff, J. Knebel, H., Heidemann, M. y Mannhertz, H.G. (1985). An improved procedure for purifying 5'-nucleotidase from various sources: evidence for tissue and species differences in their molecular mass and affinity for F-actin.. Eur. J. Biochem., 151, 377-383.

Dieckhoff J., Mollenhauer, J., Kuhl, U., Niggemeyer, B., Von der Mark, K. y Mannhertz, H.G. (1986). The extracellular matrix proteins laminin and fibronectin modify the AMPase activity of 5'-nucleotidase from chicken gizzard smooth muscle.. FEBS Lett., 195, 82-85.

Donard, J., Bonnafous, J.C. y Mani, J.C. (1978). Effects of Con-A and other lectins on pure 5'-nucleotidase isolated from lymphocyte plasma membrane.. Biochem. Biophys. Res. Commun., 82, 685-692.

Egloff M.-P., W. Cohen P. T., Reinemer P. & Barford D. (1995). "Crystal structure of the catalytic subunit of human protein phosphatase 1 and its complex with tungstate". *J. Mol. Biol.* 254, 942-959.

Fiske, C.H. y Subbarow Y. (1925). Colorimetric determination of phosphorus.. J. Biol. Chem., 66, 375-400.

Flocke, K. y Mannhertz, H.G. (1991). Isolation and cahracterization of 5'-nucleotidase of human pancreatic tumor cell line.. Biochim. Biophys. Acta., 1076, 273-281.

Goldberg J., Huang H., Kwon Y., Greengard P., Nairn A. C. & Kuriyan J. (1995). "Three-dimensional structure of the catalytic subunit of protein serine/threonine phosphatase-1". *Nature* 376, 745-753

Griffith J. P. *et al.* (1995). "X-ray structure of calcineurin inhibited by the immunophilinimmunosuppressant FKB12-FK506 complex". *Cell* 82, 507-522.

Grondal, E.J.M. y Zimmermann, H. (1987). Purification, characterization and cellular localization of 5'-Nucleotidase from torpedo electric organ.. Biochem. J., 245, 805-810.

Gupta, A. y Sharma, C.B. (1996). Purification to homogeneity and characterization of plasma membrane and Golgi aparatus-specific 5'-adenosine monophosphatases from peanut cotyledons.. Plant Sci., 117, 65-74.

Itho, R. y Yamada, K. (1991). Determination of cytolasmic 5'-nucleotidase wich preferntially hydrolyses 6-hidroxiurine nucleotides in pig, rat and human tissues by inmunotitration.. Int. J. Biochem., 23, 461-465.

Itho, R. (1993). IMP-GMP 5'-nucleotidase.. Comp. Biochem. J., 105B, 13-19.

James, S. y Richardson, P.J. (1993). Production of adenosin from extracellular ATP at the striatal cholinergic synapse.. J. neurochem., 219, 219-227.

Johansson, N.G. y Eriksson, S. (1996). Structure-activity relationships for phosphorylation of nucleoside analogs to monophosphates by nucleoside kinases.. Acta. Biochim. Pol., 43, 143-160.

Kissinger C. R. *et al.* (1995). "Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP 12-FK506-calcineurin complex". *Nature* 378, 641-644.

Klabunde T., Sträter N., Fröhlich R., Witzel H., & Krebs B. (1996). "Mechanism of Fe(III)-Zn(II) purple acid phosphatase based on crystal structures". *J. Mol. Biol.* 259, 737-748.

Kreutzberg, G.W. Y Barron K.D. (1978). 5'-nucleotidase of microglial cells in the facial nucleus during axonal reaction.. J. Neurocytol., 7(601), 610

Oestergaard, J., Larsen, K. y Jochimsen, B.U. (1991). 5'-nucleotidase from soybean (*Glycine max*) root nodules: partial purification and characterization. regulation in sterile tissue culture.. J. Plant Physiol., 138(4), 387-393.

Pesi, R., Baiocchi, C., Tozzi, M.G. Y Camci, M. (1994). Sinergic action of ADP and 2,3-bisphosphoglycerate on the modulation of cytosolic 5'-nucleotidase.. Biochim. Acta., 1294, 191-194.

Polya, G.M. (1974). Regulation of plant 5'(3')-ribonucleotide phosphohidrolase by ciclic nucleotides and pyrimidine, purine and cytokinin ribosides.. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 1299-1303.

Polya, G.M. (1975). Purification and characterization of cyclic nucleotide regulated 5'-nucleotidase from potato.. Biochim. Biophys. Acta., 384, 443-457.

Reis, J. (1934). La nucleotidase et sa relation avec la désamination des nucléotides dans la coeur et dans la muscle.. Bull. Soc. Chim. Biol., 16, 385-394.

Ribeiro, J.A. y Sebastiao, A.M. (1987). On the role, inactivation and origin of endogenous adenosine at the frog neuromuscular juntion.. J. physiol. London, 384, 571-585.

Rise, G., Stochaj, U., Elsasser, K. y Dieckhoff, J. (1989). Structural comparision of the 68 kDa laminin-binding protein and 5'-nucleotidase from chicken muscular sources: evidence against a gross strctural similarity of both proteins.. Biochim. Biophys. Acta., 994, 258-263.

Sambrook, Joseph. , Russell D.W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Schoen, S.W., Graeber, M.B., Tóth, L. y Kreutzberg, G.W. (1988). 5'-nucleotidase in postnatal ontogeny of rat cerebellum: a marker for migrating

nerve cells?. Dev. Brain Res., 39, 125-136.

Schoen, S.W., Leutenecker, B., Kerutzberg, G.W. y Singer W. (1990). Ocular dominance plasticity and developmental changes of 5'-nucleotidase distributions in the kitten visual cortex.. J.Comp. Neurol., 296, 379-392.

Synnestvedt, K. Furuta,G.T. Comerford K.M. Louis, N. Karhausen, J. Eltzhig, H.K. Hansen, K.R. Thompson, L.F. (2002). Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia.. J. Clin. Invest, 110-993-1002.

Skladanowski, A.C. Hoffmann, C., Krass, J., Jastorff, B. y Makarewics, W. (1996). Structure-activity relationships of cytoplasmic 5'-nucleotidase substrate sites.. Biochim. J., 334, 1001-1007.

Stochaj, U. Dieckhoff, J., Mollenhauer, J., Cramer, M. Mannhertz H.G. (1989). Evidence for direct interaction of chicken gizzard 5'-nucleotidase with laminin and fironectin.. Biochim. Biophys. Acta., 992(a), 385-392.

Stochaj, U., Flocke, K., Methes, W. y Mannherz (1989). 5'-nucleotidase from chicken gizzard and human pancreatic adenocarcinoma cells are anchored to the plasma membrane via phosphatidylinositol-glycan.. Biochem. J., 226(b), 33-40.

Stochaj, U., Richter, H. Y Mannherz, H.G. (1990). Chicken gizzard 5'-nucleotidase is a receptor for the extracellular matrix component fibronectin.. Eur. J. , 51, 335-338.

Stochaj, U., Mannherz, H.G. (1992). Chicken gizzard 5'-nucleotidase function as a binding protein for the laminin/nidogen complex.. Eur. J. , 59, 364-372.

Sträter N., Klabunde T., Tucker P., Witzel H., & Krebs, B. (1995). "Crystal structure of a purple acid phosphatase containing a dinuclear Fe(III)-Zn(II) active site". *Science* 268, 1489-1492

Svetlana T. Mihaylova-todorova, Latchezar D. Todorov, & Westfall, D.P. (2002). "Enzyme Kinetics and Pharmacological Characterization of Nucleotidases Released from the Guinea Pig Isolated Vas Deferens during Nerve Stimulation: Evidence for a Soluble Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase-Like ATPase and a Soluble Ecto-5'-Nucleotidase-Like AMPase". *JPET* 302:992–1001.

Synnestvedt, K., Furuta, G.T., Comerford, K.M., Louis, N., Karhausen, J., Eltzhig, H.K., Hansen, K.R., Thompson, L.F., & Colgan, S.P. (2002). "Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia". *J. Clin. Invest.* 110:993–1002.

Sunderman, F.W. Jr. (1990). The clinical biochemistry of 5'-nucleotidase.. Ann. Clin. Lab. Sci., 20, 123-139.

Takei, S., Totsu, J.I. y Nakanichi, K. (1969). Metabolic Pathway of NAD in yeast cells V. Properties of nucleotide pyrophosphatase and its relation to 5'-nucleotidase.. Agr. Biol. Chem., 33, 1251-1256.

Tsushima, K. (1986). Properties of cytosol 5'-nucleotidase and its role in purine nucleotide metabolism. Advan. Enzyme Regul., 25, 181-200.

Vogel, M., Kowalewski, H.J., Zimmermann, H., Janetzko, A., Margolis, R.U. y Wollny, H.E. (1991). Association of the HNK-1 epitope with 5'-nucleotidase from *torpedo marmorata* (electric-ray) electric organ.. Biochem. J., 284, 261-264.

Yamazaki, Y., Truong, V.L. y Lowenstein, J.M. (1991). 5'-nucleotidase I from rabbit heart.. Biochemistry, 30, 1503-1509.

Zimmermann, H. (1992). 5'-nucleotidase: molecular structure and functional aspects.. Biochem. J., 285, 345-365.

