

PROBLEMA BIOQUÍMICO

Tatiana Romero García y Angélica Rueda

Correo E: arueda@cinvestav.mx

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ATPasa DE LA BOMBA SERCA EN HOMOGENADOS DE TEJIDO MUSCULAR

Estudios en ratas con alimentación restringida han mostrado que la desnutrición induce cambios en el metabolismo y en el tipo de fibras que componen al músculo rápido EDL (*extensor digitorum longus*); lo cual se evidencia también por cambios en la expresión de diversas proteínas de la maquinaria contráctil, mitocondriales y del metabolismo glicolítico (1).

Por otro lado, en el síndrome metabólico también se presentan alteraciones en el músculo cardíaco que están relacionadas con la expresión y/o actividad de canales iónicos y bombas de Ca^{2+} como el receptor de rianodina (2) y la bomba ATPasa del retículo sarco/endoplásmico (o bomba SERCA) (3). Ésta última es una ATPasa que bombea Ca^{2+} del citoplasma al lumen del retículo sarcoplásmico a expensas de la hidrólisis de ATP, favoreciendo la relajación muscular y recuperando los niveles de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares para la próxima contracción.

En mamíferos la bomba SERCA esta codificada por 3 genes (SERCA 1, 2 y 3) que generan por lo menos 9 isoformas (4).

Un método apropiado para determinar si la actividad enzimática de cualquier isoforma de la bomba SERCA esta alterada, es por medio de la medición directa de su actividad de ATPasa, cuyo ejercicio se muestra a continuación.

PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Para determinar la actividad de ATPasa de la bomba SERCA, se utiliza un método espectrofotométrico basado en la formación de un complejo coordinado con el ion fosfato que se libera como producto de la hidrólisis de ATP, generando una coloración azul característica del complejo antimonio-fosfomolibdato conocido como azul de molibdato cuya absorbancia (Abs.) se puede medir en un espectrofotómetro a 850 nm, de forma que la tasa de liberación de fosfato sirve como reportero directo de la actividad

enzimática de la bomba (5). Este método permite determinar la actividad de diferentes ATPasas además de la SERCA, mediante la utilización de inhibidores específicos; como en el caso de la ATPasa de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ que es inhibida por ouabaína. Para el caso de la bomba SERCA, se utiliza tapsigargina (Tgn), lo que nos permite determinar la actividad específica de esta bomba al realizar la sustracción de los valores de Abs. con Tgn a los valores de Abs. de actividad total (sin inhibidor).

Se utilizan homogenados de músculo esquelético de ratas controles (Ctl) y con síndrome metabólico (SM), a los cuales se les determina la concentración de proteína mediante el método de Lowry. Para el tubo de actividad total de ATPasa, 50 μg de proteína del homogenado se incuban a 37°C durante 5 min con amortiguador que contiene (en mM): KCl 80, MOPS 25, MgCl_2 3, Azida de Na^+ 5 y EGTA 0.2 (pH 7.0 con TRIS base), también se adiciona Ca^{2+} 0.2, y el ionóforo de Ca^{2+} A23187 2 μM . La reacción se inicia con 1 mM de ATP. Para los tubos de actividad inespecífica (es decir, la actividad de ATPasa no dependiente de SERCA) se adicionan los sustratos anteriores además de 1 μM de Tgn.

Después de iniciar la reacción, se toman alícuotas de 100 μL después de 0, 5, 10, 15 y 30 minutos, que se añaden a tubos con 0.9 mL de solución de coloración, la cual contiene (en mM): H_2SO_4 125, ácido ascórbico 10, tartrato antimónico de potasio (III) 0.4 y heptamolibdato de amonio 0.5. La Abs. a 850 nm se mide 10 min después en un espectrofotómetro.

En la Tabla 1 se muestran valores de $\text{Abs}_{850\text{nm}}$ con y sin Tgn, a diferentes tiempos (0, 5, 10, 15, y 30 min) de homogenados control y SM, respectivamente.

Una vez que se tienen las Abs. que corresponden exclusivamente a la actividad de SERCA, estos valores se interpolan en una curva patrón de PO_4^{-4} (Gráfica 1), para determinar los nmoles de PO_4^{-4} liberado como se muestra con la Ecuación No. 1.

$$\text{nmoles } \text{PO}_4^{-4} = \frac{\text{Abs.} - 0.0195}{0.0185}$$

TABLA 1. Absorbancias obtenidas a 850 nm de homogenados de músculo esquelético de ratas control y con síndrome metabólico. La actividad total corresponde a todas las ATPasas en el homogenado, la actividad inespecífica, (en presencia de Tgn) representa la actividad de todas las ATPasa insensibles a este compuesto; y la diferencia (actividad de SERCA) corresponde a la actividad específica atribuida a la bomba SERCA.

Muestra	T i e m p o (min)	Tubo de actividad total (Abs _{850nm})	Tubo de actividad inespecífica (Abs _{850nm})	Actividad de SERCA (Abs _{850nm})
Ctl	0	0.1192	0.0639	
	5	0.1993	0.0738	
	10	0.2656	0.0663	
	15	0.3255	0.0739	
	30	0.5416	0.0718	
SM	0	0.0652	0.0533	
	5	0.1639	0.0550	
	10	0.2234	0.0561	
	15	0.2648	0.0568	
	30	0.3630	0.0583	

ACTIVIDADES Y PREGUNTAS

1. Completa los valores de la columna de actividad de SERCA en la Tabla 1, realizando la sustracción correspondiente.

2. Utiliza la Ecuación No. 1 para determinar los nanomoles de PO₄⁻⁴ a partir de la absorbancia de SERCA, para cada tiempo y normalízalo con respecto a la cantidad de proteína utilizada.

3. Grafica la actividad de ATPasa de SERCA (nmol de PO₄⁻⁴ liberado/mg Pt) con respecto al tiempo
- (min) para muestras control y con síndrome metabólico. Trata de mantener la misma escala de valores en X y Y para ambas muestras.

4. Determina las velocidades de reacción para cada caso expresadas como nmol de PO₄⁻⁴/mg de Pt/min.

5. Comparar y discutir los resultados de actividad de ATPasa de muestras control y con síndrome metabólico.

REFERENCIAS

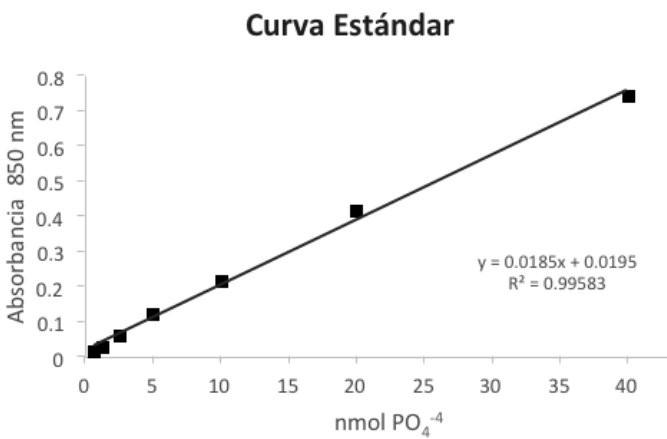
1. Ruiz-Rosado A, Cabrera-Fuentes HA, González-Calixto C, et al. (2013). Influence of chronic food deprivation on structure-function relationship of juvenile rat fast muscles. J Muscle Res Cell Motil. 34:357-368.

2. Barrera-Lechuga TP, Guerrero-Hernández A, Arias-Montañó JA, Rueda A. (2010). Impaired function of cardiac ryanodine receptors in an experimental model of metabolic syndrome. Biophys J 98(3) Suppl 1:106a-107a.

3. Balderas-Villalobos J, Molina-Muñoz T, Mailloux-Salinas P, et al. (2013). Oxidative stress in cardiomyocytes contributes to decreased SERCA2a activity in rats with metabolic syndrome. Am J Physiol. 305(9):H1344-53.

4. Brini M1, Cali T, Ottolini D, Carafoli E. (2012). Calcium pumps: why so many? Compr Physiol. 2(2):1045-60.

5. Bartolommei G, Moncelli M, Tadini-Buoninsegni F. (2013). A method to measure hydrolytic activity of adenosinetriphosphatases (ATPases). PLOS one. 8:1-9



Grafica 1. Curva estándar de de fosfatos. Se presentan los datos de Abs. a 850 nm vs. los nmoles de fosfato. Las mediciones se realizaron por duplicado, por lo tanto los valores de Abs.son el resultado del promedio. Se inserta el resultado de la regresión lineal y el valor del coeficiente de correlación (R²).