

AISLAMIENTO Y SEMI-PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA PROTEIN-FOSFATASA TIPO 2A A PARTIR DE INSUMOS DE BAJO VALOR COMERCIAL: SUBPRODUCTOS DE LAS PESQUERIAS DE CALAMAR Y CANGREJO

Sujey Gómez-Juárez, Arturo P. Sierra-Beltrán y Norma Y. Hernández-Saavedra*
CIBNOR. Unidad de Patología Marina. Laboratorio de Genética Molecular.
Mar Bermejo No. 195. Col. Playa Palo de Sta. Rita. La Paz 23095, B.C.S., México. Fax: 6121253625.
e-mail: nhernan@cibnor.mx.

Palabras clave: protein-fosfatasa, PP2A,

Introducción. Los florecimientos algales de cianobacterias y dinoflagelados tóxicos o nocivos, son genéricamente conocidos como mareas rojas. Estos eventos pueden tener un origen natural o antropogénico, y se presentan en cuerpos de agua dulce y marina de todo el mundo, causando severos problemas ambientales. Las toxinas producidas por estas microalgas son las responsables de los efectos adversos en la salud de humanos y animales domésticos y silvestres. Dentro de las toxinas producidas por cianobacterias podemos mencionar a las microcistinas y nodularinas, en el caso de dinoflagelados tóxicos el ácido okadaico, sus congeneres y las toxinas diarreicas. Las toxinas antes mencionadas inhiben la actividad de las protein-fosfatasas PPI y PP2A, que son las dos formas predominantes de protein-Ser/Thr fosfatasas localizadas en células de mamíferos. Se ha propuesto en varios países para la detección de estas toxinas la realización de ensayos de inhibición, estableciéndose, principalmente, en formatos de microplaca. Este método es mas simple y económico que los usados convencionalmente para la detección de la toxinas en aguas y productos contaminados, como lo son el inmunoensayo (ELISA), la cromatografía líquida acoplada con espectroscopia de masas (LCMS) basada en la estructura y el bioensayo en ratón (MBA), en el que se sacrifican un gran numero de animales. Si bien esta alternativa metodológica propuesta adolece del alto costo inherente a que la fuente mas confiable de obtención de la enzima es el producto recombinante del gen humano.

Objetivo. Evaluación de insumos no convencionales (subproductos del procesamiento de productos pesqueros y productos marinos de bajo valor comercial) para la obtención de protein-fosfatasa tipo 2A (PP2A).

Materiales y Métodos. La preparación de homogenados para estandarizar las técnicas de aislamiento y purificación de PP1 y PP2A se realizaron a partir de hígado bovino y buffer de Tris 50mM, pH 7.4, con inhibidores enzimáticos. El homogenado (Ho) se centrifugo a 6000xg por 30 minutos, recuperando el sobrenadante (S₁). Centrifugando a 100,000xg durante una hora se colecto finalmente el sobrenadante S₂. Las preparaciones S₂ se dializaron contra el mismo buffer de extracción sin inhibidores (S_{2d}) y se cuantificó el contenido proteico mediante el método de Lowry. Con los extractos S_{2d} se realizó una purificación parcial mediante precipitación fraccionada con sulfato de

amonio al 12.5%, 25%, 37.5% y 50% de saturación (1). A las fracciones obtenidas se les dializo y practicó un segundo análisis PAGE y de actividad. El precipitado obtenido de la fracción del 50% de saturación se cargó en una columna de intercambio iónico DEAE-Sephadex A50 (equilibrada y lavada con el mismo buffer). La elusión de las proteínas se realizó con buffer y NaCl 0.1 y 0.5M. La detección y cuantificación de la actividad enzimática se llevó a cabo por ensayo de inhibición colorimétrica (2) en microplaca, con p-nitrofenil fosfato como sustrato a una absorbancia de 405 nm.

Resultados y discusión. Mediante la precipitación fraccionada con NH₂SO₄ se obtuvieron preparaciones parcialmente purificadas de la PP2A, ya que mediante los ensayos de actividad la enzima se localizó en la fracción del 50% de saturación. La cromatografía de intercambio iónico permitió la purificación parcial de la PP2A con NaCl 0.5 M, obteniéndose preparaciones con elevada actividad específica y buena estabilidad. Los resultados obtenidos a la fecha, aunque son preliminares, demuestran la eficiencia del protocolo de purificación aplicado, obteniéndose la estandarización del mismo con hígado bovino. Actualmente se está trabajando con los insumos a evaluar como lo son carne de calamar y desechos de cangrejo que son los productos de interés de este estudio.

Agradecimientos.

Este proyecto está siendo financiado por el proyecto RP1 del CIBNOR.

Referencias.

1. Williams Curtis A. y Chanse Merrill W. 1967. *Methods in Immunology and Immunochemistry*, V volúmenes.
2. Wheldrake, JF, Bilnay, A, Rosenberg, L, Murray, LAW, Bond, PM, Steffensen, DA y Nicholson, BC. 1996. *Detection of cyanobacterial peptide toxin by a non radioactive protein phosphatase inhibition assay*. Urban Water Research Association of Australia. Melbourne, Australia. pp 44.