



# Estimulación de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática por etanol y otros factores

Gustavo Benaim<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Biólogo Celular

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 31 de Diciembre del 2000 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

## RESUMEN

A pesar de que el alcohol se ha consumido por todas las civilizaciones desde que se conoce la historia del hombre, aún se desconoce el mecanismo mediante el cual ejerce su efecto farmacológico. Menos se sabe de las razones que convierten a un individuo en alcohólico y a otros no. Tampoco se sabe mucho acerca de los mecanismos de transmisión de señales que en última instancia definen el estado de ánimo.

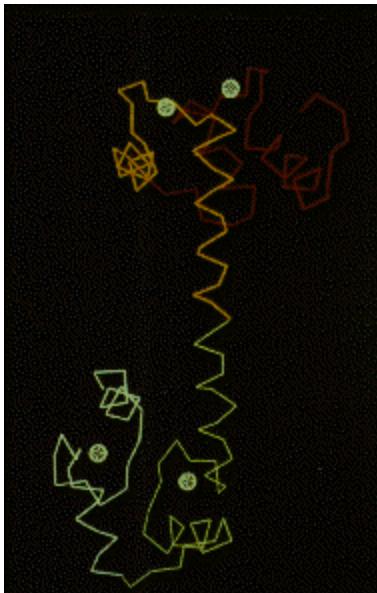
## INTRODUCCIÓN

A pesar de que el alcohol se ha consumido por todas las civilizaciones desde que se conoce la historia del hombre, aún se desconoce el mecanismo mediante el cual ejerce su efecto farmacológico. Menos se sabe de las razones que convierten a un individuo en alcohólico y a otros no. Tampoco se sabe mucho acerca de los mecanismos de transmisión de señales que en última instancia definen el estado de ánimo. Sin embargo, existen evidencias circunstanciales recientes que señalan al calcio, mensajero fundamental en los mecanismos de transmisión de señales, como responsable de parte de estos fenómenos. Así, se ha reportado en estudios

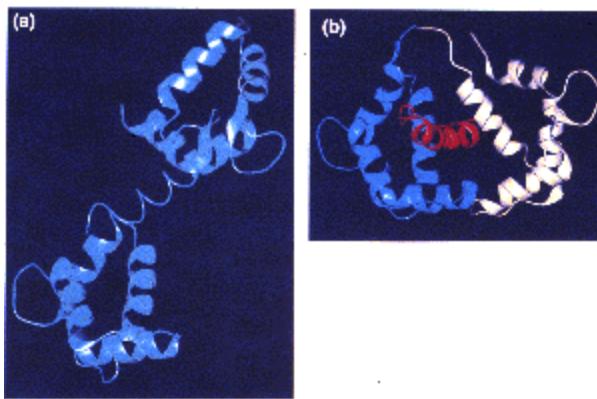
realizados por un grupo de psiquiatras en pacientes maníaco-depresivos, que durante la fase maníaca, la concentración de calcio intracelular es menor que durante la fase depresiva. Inclusive, el tratamiento con litio, cuando es exitoso, revierte a los pacientes a una distribución normal de las concentraciones de calcio intracelular. No es difícil concebir que, como el calcio regula la liberación de neurotransmisores, una perturbación en los mecanismos homeostáticos responsables del mantenimiento de las concentraciones báslas intracelulares de este catión, podría ser responsable de algunas de estas manifestaciones clínicas.

## LA BOMBA DEL CALCIO

La bomba de calcio (o  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa) de la membrana plasmática se ha reconocido como la enzima fundamental en la regulación de la concentración citoplasmática basal de este catión. La  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática es estimulada por calmodulina (CaM), su modulador proteico natural (Fig. 1), fosfolípidos acídicos y ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga (15). También puede ser estimulada mediante fosforilación por la protein-quinasa A y por la protein-quinasa C. La proteólisis parcial de la enzima simula el efecto de la CaM (1), lo cual ha permitido elaborar un modelo mediante el cual la CaM removería una compuerta auto-inhibitoria de la enzima permitiendo así un mayor acceso de los sustratos ( $\text{Ca}^{2+}$  y ATP) al sitio activo (2, 12, 13).



Estructura tridimensional de la Calmodulina Se puede observar los 4 dominios de union de calcio y el alto contenido de estructura ahelices.



Modelo de la estructura tridimensional de la calmodulina (a) y de su interacción con la quinasa de la cadena ligera de la miosina. Se puede observar como la calmodulina se pliega alrededor del sitio de interacción con la quinasa. Este modelo expone la altísima flexibilidad de la calmodulina.

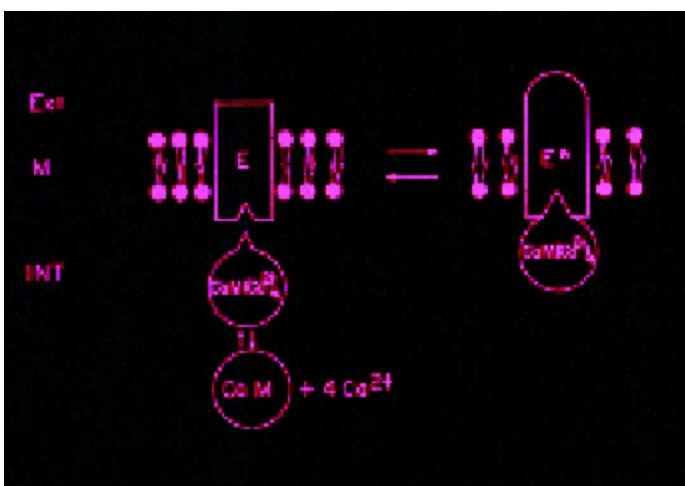


Fig. 1 Modelo de Interacción de la calmodulina con la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ . El modelo destaca que la interacción es directa, lo cual permite la purificación de la enzima mediante una columna de afinidad con calmodulina-agarosa.

La actividad de la enzima también puede ser incrementada mediante la auto-agregación de la enzima, lo cual permite sugerir que la enzima podría presentar una transición de monómero a dímero (20). Los solventes orgánicos como el dimetilsulfóxido y los poli-alcoholes también simulan el efecto estimulatorio de la CaM (3, 4, 6), lo cual sugiere que también actúan removiendo la mencionada compuerta auto-inhibitoria

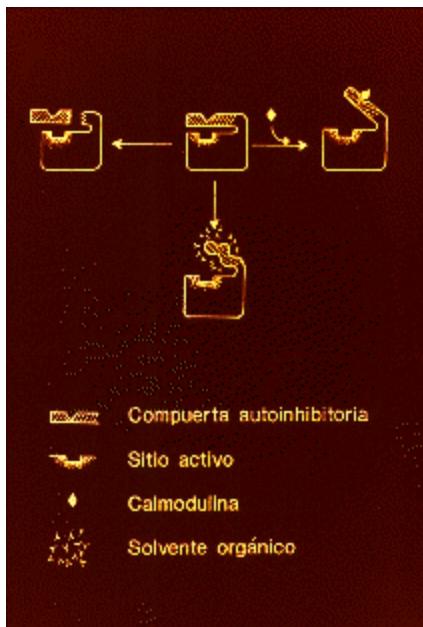


Fig 2. Modelo de Interacción de distintos efectores sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática. El modelo muestra de la remoción de la compuerta autoinhibitoria mediante la unión de esta a diferentes ligandos o mediante proteólisis parcial. En todos los casos, la resultante es la misma: Un incremento en la accesibilidad de los sustratos

Tomando en cuenta que la interacción de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa con la CaM es directa, la enzima puede ser purificada a homogeneidad a partir de membranas asiladas de eritrocitos humanos, solubilizadas con detergente, mediante la utilización de una columna de afinidad de calmodulina unida covalentemente a una matriz de agarosa (1), de la cual se eluye al quitar el calcio del medio.



Fig. 3 Electroforesis en gel de poliacrilamida del producto de elución de la columna de afinidad de calmodulina-agarosa luego de la quelación del  $\text{Ca}^{2+}$  con EGTA. El gel muestra una banda única de 140.000 Da., correspondiente a la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa. A la izquierda, las bandas corresponden a patrones de peso molecular conocido.

## EFFECTOS DEL ETANOL

Recientemente hemos obtenido evidencias de que el etanol y otros alcoholes alifáticos de cadena corta estimulan la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de eritrocitos humanos, tanto en su forma purificada como sobre la enzima *in situ* (21).

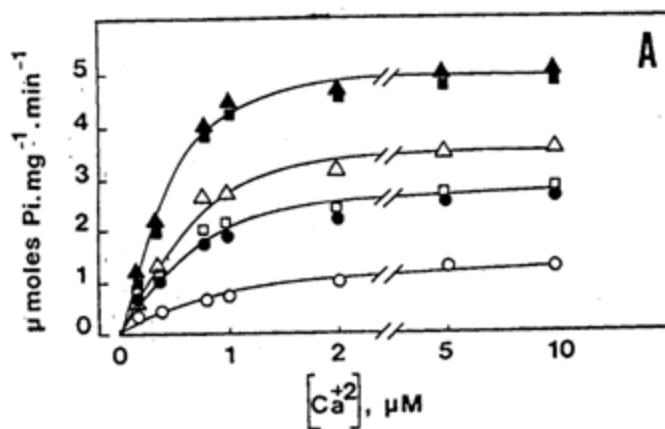


Fig. 4.- Efecto del etanol, calmodulina y proteólisis parcial sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa purificada de eritrocitos humanos. La actividad enzimática es expresada en micromoles de ATP hidrolizado por mg. Proteína por minuto. Control (O); Calmodulina (●); Etanol ( $\Delta$ ); Etanol plus calmodulina ( $\blacktriangle$ );  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa tripsinizada ( $\square$ );  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa tripsinizada plus etanol ( $\blacksquare$ ).

El transporte de calcio en vesículas invertidas de eritrocitos humanos también es estimulado por el etanol de una manera dosis-dependiente, lo cual permite inferir que etanol puede estimular esta actividad *in vivo* (21).

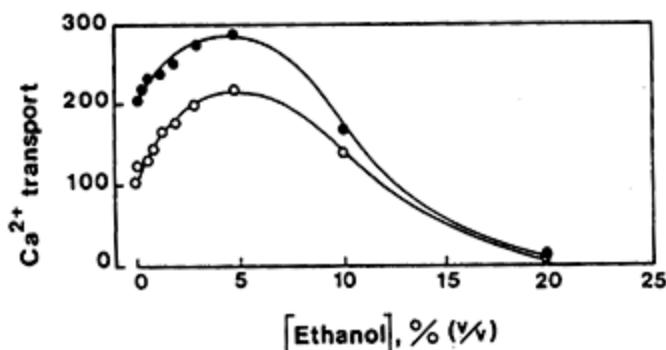


Fig. 5 Estimulación del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en vesículas invertidas (IOVs) de eritrocitos humanos por etanol. El transporte de calcio se determinó siguiendo los cambios de absorbancia del arseenazo III al par de longitudes de onda 675-685 en un espectrofotómetro de doble longitud de onda. Control (O); Calmodulina (●).

El mecanismo de acción del alcohol es distinto al de la calmodulina, modulador proteico natural de esta enzima, ya que su efecto es aditivo, tanto con respecto a la velocidad máxima de la enzima, como sobre su afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  y ATP (8). El efecto del etanol sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa es totalmente revertido al lavar las membranas mediante centrifugación en un medio sin alcohol, lo cual sugiere que el efecto inducido por el etanol sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa en condiciones farmacológicas, puede ser revertido una vez que el alcohol haya sido eliminado. Por otra parte, siguiendo con este mismo estudio, se demostró que el efecto del etanol no se confina a la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de eritrocitos, sino que es capaz de estimular también a la enzima homóloga de *Leishmania mexicana* (5), lo cual sugiere la universalidad de este efecto, ya que la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa

de la membrana plasmática es una enzima, que además de ser ubicua en células eucarióticas (15), está bastante conservada evolutivamente (7, 9, 10).

## ESTIMULACIÓN

Otros resultados más recientes de nuestro laboratorio, han demostrado que el fosfatidiletanol es capaz de estimular la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa a niveles mayores que otros fosfolípidos naturales (23).

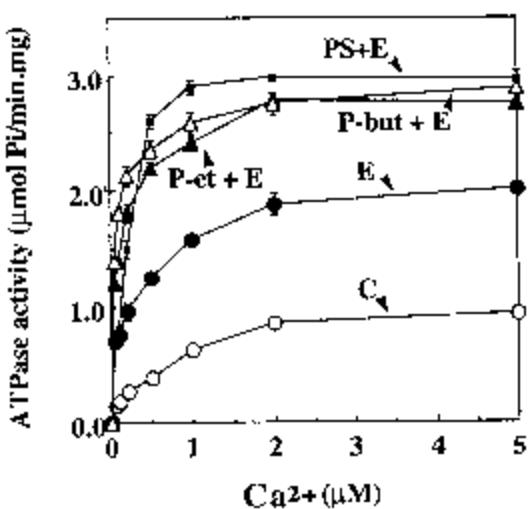


Fig. 6 Efecto del fosfatidiletanol y otros fosfolípidos acídicos sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa purificada de eritrocitos humanos. Se puede observar el efecto aditivo del fosfatidiletanol y otros fosfolípidos acídicos sobre el efecto del etanol. C: Control; E: Etanol; P-et: fosfatidiletanol, P-but: fosfatidilbutanol; PS: fosfatidilserina

Este efecto es interesante, ya que este fosfolípido se acumula en la membrana mediante un proceso de transfosfatidilación mediado por la fosfolipasa D, luego de una ingesta alcohólica, presentando una tasa de degradación muy lenta (23). De hecho, se ha postulado que parte del efecto del etanol en humanos puede ser atribuido a la acumulación en la membrana de fosfatidiletanol (2). Los hallazgos anteriores nos permiten postular que la combinación del etanol con el fosfatidil etanol formado a partir de éste podría tener un efecto sinergístico sobre la activación de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa y el consecuente transporte de calcio.

Más recientemente hemos encontrado que el efecto del etanol es diferente entre las distintas isoformas de la enzima presentes en humanos. Así, hemos observado que el etanol tiene un

efecto diferencial sobre cuatro isoformas diferentes de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática (hPMCA1c, hPMCA2g, hPMCA4a y hPMCA4b). Estas isoformas son producto de 3 genes diferentes y difieren en cuanto a estructura y en algunas de sus propiedades (16, 17, 18). Asimismo estas isoformas se encuentran expresada de manera diferencial en los distintos tejidos. Las isoformas hPMCA1b y hPMCA4b se encuentran expresadas en las membranas de todas las células eucariotas estudiadas hasta el momento, la isoforma hPMCA4a se encuentra principalmente en músculo, mientras que la isoforma hPMCA2g se encuentra expresada principalmente en células nerviosas, cerebro y cerebelo (17, 18). Para realizar este estudio, las 4 isoformas fueron expresadas mediante un sistema de sobre-expresión a través de baculovirus. Para ello, baculovirus recombinantes conteniendo el cDNA para cada una de las isoformas fueron utilizados para infectar una línea celular de insectos (Sf9). Posterior a la expresión, las proteínas de interés fueron caracterizadas tanto desde el punto de vista bioquímico como funcional (19). Las 4 isoformas resultaron ser estimuladas por el etanol en una forma dosis-dependiente, observándose igualmente en todas ellas un efecto aditivo del etanol sobre la estimulación obtenida por la CaM. Sin embargo, existieron diferencias significativas entre las mismas en cuanto a la concentración del alcohol a la cual se alcanzó el máximo efecto estimulatorio. En este sentido, fue muy interesante observar que la isoforma más sensible al etanol es la hPMCA2g, la cual está ubicada fundamentalmente en cerebro, cerebelo y tejido nervioso (19). La dosis de etanol con la cual se alcanza el máximo de estimulación en esta isoforma está precisamente en el rango farmacológico (21), fácilmente adquirible en la sangre luego del consumo normal de alcohol. Estos resultados nos permiten sugerir que el efecto del etanol en humanos podría deberse a la estimulación del transporte de calcio a nivel de estos tejidos, con la consecuente disminución en la concentración citoplasmática de este catión. Esto tendría indudables consecuencias en la liberación de ciertos neurotransmisores, ya que es bien conocido que este fenómeno está regulado por los niveles de calcio en estas células.

Como se mencionó anteriormente, se ha encontrado en estudios con pacientes maníaco-depresivos, una correlación entre la concentración de calcio citoplasmático y el estado anímico. Específicamente, durante la crisis maníaca, los pacientes presentaron una menor concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático en los eritrocitos, que durante la crisis depresiva. El estado de ánimo durante la crisis maníaca se asemeja al inducido por la intoxicación etílica, en cuanto a la manifestación de un cuadro eufórico. Aún cuando esta relación es hasta el presente especulativa, es perfectamente factible, y merece ser investigada con detalle.

## MECANISMO DE ACCIÓN

En otro orden de ideas, recientemente también hemos adelantado con respecto a la identificación del sitio de interacción de la bomba de calcio con el etanol. Durante el estudio del efecto del etanol sobre las diferentes isoformas de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, pudimos observar que dos de las isoformas, las cuales son productos de un mismo gen, las isoformas hPMCA4a y hPMCA4b, se comportaron de manera diferencial con el etanol. Estas isoformas únicamente difieren en cuanto a la secuencia en la porción C-terminal de la proteína. Estos hallazgos sugieren que región de la enzima pudiera ser importante para el mecanismo de acción del etanol. Con el objeto de verificar esta posibilidad, estudiamos el efecto del etanol sobre dos formas truncadas de la enzima originadas a partir de la isoforma hPMCA4b. Una de las formas truncadas carece de

los 44 aminoácidos hacia la región C-terminal (hPMCA4bD 44), mientras que la otra forma presenta una truncación de 139 aminoácidos (hPMCA4bD 139) hacia esta misma región. Estas formas truncadas fueron expresadas mediante el mismo sistema descrito anteriormente (19). Cuando se ensayó el efecto del etanol sobre la actividad enzimática de la isoforma hPMCA4bD 44 se observó que el etanol estimuló a esta proteína de manera similar al efecto observado sobre la isoforma nativa hPMCA4b. Por el contrario, cuando se determinó el efecto del etanol sobre la forma truncada hPMCA4bD 139 el etanol no tuvo ningún efecto en la enzima (19). Estos resultados demuestran que la región relevante en la enzima para el efecto del etanol está ubicada entre estos 95 aminoácidos diferentes entre las dos formas truncadas.

## EFFECTORES NATURALES

El efecto del etanol sobre la actividad hidrolítica de ATP y sobre el transporte de calcio asociado es mayor que el reportado hasta el presente mediante el uso de otros efectores naturales o artificiales (8, 15), lo cual indica que la bomba de calcio de la membrana plasmática debe ser regulada fisiológicamente por mecanismos desconocidos hasta el presente. En este sentido nos propusimos identificar la posible existencia de estos efectores naturales. Entre los candidatos que decidimos estudiar, tomando en cuenta sus características físico-químicas y su estructura molecular (compuestos anfifílicos con grupos "hidroxilo" libres) se encuentra el diacilglicerol, importante segundo mensajero formado mediante la activación de receptores por ciertas hormonas y neurotransmisores, que conllevan a la hidrólisis del precursor fosfatidil inositol 4,5 - bisfosfato (11). Resultados recientes de nuestro laboratorio demuestran que este mensajero estimula a la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa a niveles superiores a los alcanzados por otros efectores naturales, reproduciendo parcialmente el efecto del etanol sobre esta enzima. Estos resultados permiten postular un modelo en el cual, luego de la estimulación de la célula por un agonista que conlleve a la entrada de calcio, por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico estimulando la fosfolipasa C g 1, paralelamente a la liberación de calcio producto de la producción de Inositol (1,4,5) tris-fosfato (IP3), el diacil glicerol recién formado, además de estimular la proteína quinasa C, estimularía a la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa, aditivamente a la calmodulina. Esto conllevaría a los resultados típicamente observados luego de la estimulación de la fosfolipasa C g 1 por un agonista apropiado, esto es, la elevación rápida pero transitoria de la concentración citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$ , regresando así a su nivel basal preparada para responder a un nuevo estímulo. Aunque este modelo es aun especulativo, representa un punto de partida interesante para el entendimiento de la complejidad involucrada en los procesos de señalización celular.

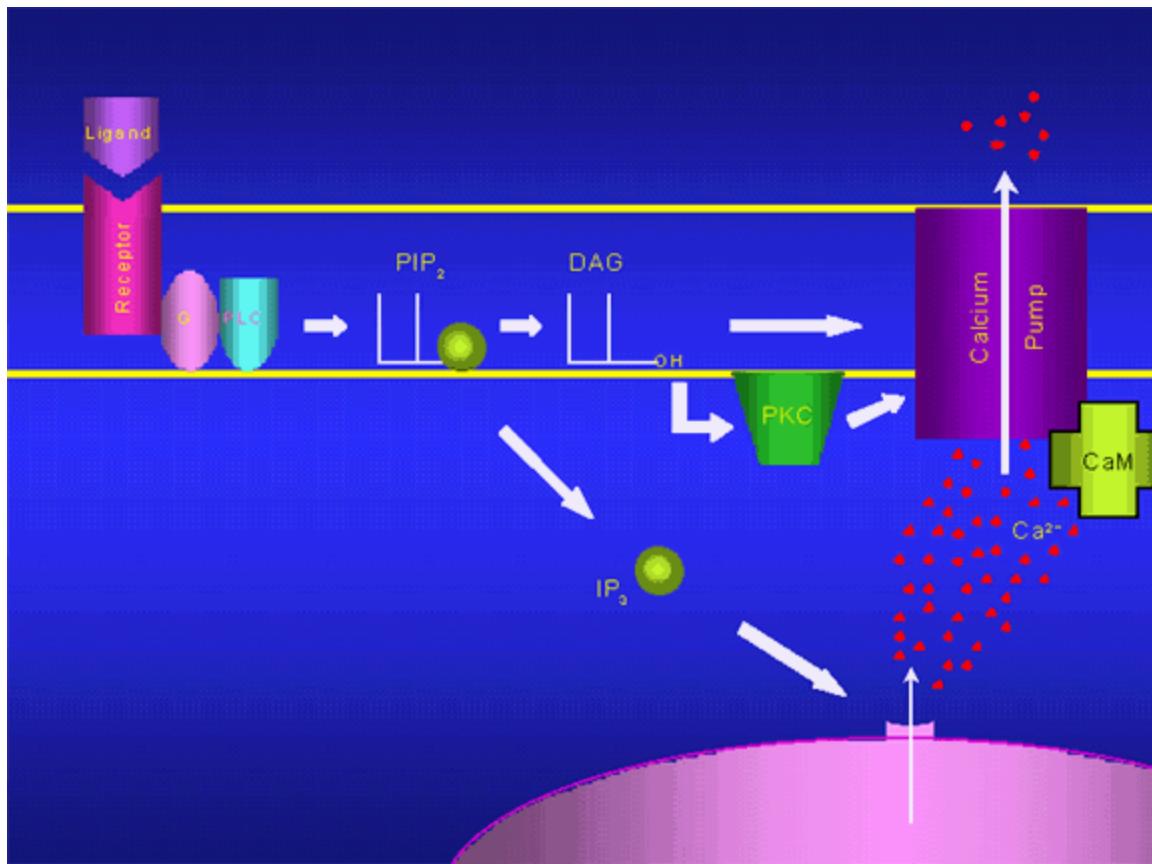


Fig. 7 Modelo de interacción del diacilglicerol y la calmodulina con la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática, luego de la elevación de la concentración intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  a través de una estimulación extracelular.

## REFERENCIAS

1. Benaim, G., Zurini, M. y Carafoli, E. (1984) Different conformational states of purified  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of the erythrocyte plasma membrane revealed by controlled trypsin proteolysis. *J. Biol. Chem.* 259: 8471-8477.
2. Benaim, G., Clark, A. y Carafoli, E. (1986) ATPase activity and  $\text{Ca}^{2+}$  transport by reconstituted tryptic fragments of calcium pump of erythrocyte plasma membranes. *Cell calcium*. 7: 175-186.
3. Benaim, G. y de Meis, L. (1989) Activation of the purified erythrocyte plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by organic solvents. *FEBS Lett.* 244: 484-486.
4. Benaim, G. y de Meis, L. (1990) Similarities between the effects of dimethyl sulfoxide and calmodulin on the red cell  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*. 1026: 87-92.
5. Benaim, G. y Romero, P.J. (1990) A calcium pump in plasma membrane vesicles from *Leishmania braziliensis*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1027: 79-84.
6. Benaim, G. (1993) Homeostasis intracelular del calcio. La calmodulina y la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática de tripanosomatídeos. *Acta Cient. Venezol.* 44: 57-66.

7. Benaim, G., Lopez-Estraño, C., Docampo, R. y Moreno, S.N.J. (1993) A calmodulin-stimulated Ca<sup>2+</sup> pump in plasma membrane vesicles from *Trypanosoma brucei*. Selective inhibition by pentamidine. *Biochem. J.* 296: 759-763.
8. Benaim, G., Cervino, V., Lopez-Estraño, C. y Weitzman, C. (1994) Ethanol stimulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1195: 141-148.
9. Benaim, G., Moreno, S. N. J., Hutchinson, G., Cervino, V., Hermoso, T., Romero, P.J., Ruiz , F., de Souza, W, y Docampo, R. (1995) Characterization of the plasma membrane calcium pump from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 306: 299-303.
10. Benaim, G. (1996) Intracellular Calcium Signaling and Regulation in Leishmania. En "Molecular and Immune Mechanism in the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis" (F. Tapia, G. Caceres-Dittmar y M. A. Sanchez, Eds.) R.G. Landes Co., Biomedical Pub., Austin, Texas. Cap. 5. pp 89-106.
11. Berridge, M. J. (1984) Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* 220: 345-360.
12. Carafoli, E., Zurini, M. y Benaim, G. (1985) The purified calcium pumping ATPase of plasma membranes. Structure and function relationships. En "Calcium in Biological Systems" (R.P. Rubin, G.B. Weiss and J.W. Putney, Jr. Eds) Plenum. pp. 265-273.
13. Carafoli, E., Zurini, M. y Benaim, G. (1986) The Ca<sup>2+</sup>-ATPase from plasma membranes En "Calcium and the Cell". (Evered, D., Whelan, J. Eds.) Wiley. Ciba Foundation Symposium. 122: 58-72.
14. Carafoli, E. (1987) Intracellular Calcium Homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 395-433
15. Carafoli, E. (1991) Calcium Pump of the Plasma Membrane. *Physiol. Rev.* 71:129-153.
16. Carafoli, E y Guerini, D. (1993) Molecular and Cellular Biology of Plasma Membrane Calcium ATPase. *Trends Cardiovasc. Med.* 3: 117-184.
17. Carafoli, E. (1994) Biogenesis: Plasma Membrane Calcium ATPase: 15 Years of Work on the Purified Enzyme. *FASEB J.* 8: 993-1002.
18. Carafoli, E., García-Martin, E. y Guerini, D. (1996) The Plasma Membrane Calcium Pump: Recent Developments and Future Perspectives. *Experientia.* 52: 1091-1100.
19. Cervino, V., Benaim, G., Carafoli, E. y Guerini, D. (1998) The effect of ethanol on the plasma membrane calcium pump is isoform specific. *J. Biol. Chem.* 273: 29811-29815
20. Coelho-Sampaio, T., Ferreira, S.T., Benaim, G. y Vieyra, A. (1991) Dissociation of purified erythrocyte Ca<sup>2+</sup>-ATPase by hydrostatic pressure. *J. Biol. Chem.* 266: 22266-22272.
21. Gandhi, C. R. y Ross, D. H. (1989) Influence of Ethanol on Calcium, Inositol Phospholipids and Intracellular Signalling Mechanisms. *Experientia.* 45: 407-413.
22. Hoek J.B., Thomas, A.P. Rooney, T.A., Higashi, K. y Rubin, E. (1992) Ethanol and Signal Transduction in the Liver. *FASEB J.* 6: 2386-2396.
23. Suju, M., Dávila, M., Poléo, G., Docampo, R. y Benaim G. (1996) Phosphatidylethanol stimulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes *Biochem. J.* 317: 933-938.