



## Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica

ISSN 0798-0264 *versión impresa*

AVFT v.21 n.1 Caracas ene. 2002



Como citar este artículo

### Efecto del Etanol y del Fosfatidiletanol sobre la $Ca^{2+}$ -ATPasa de la Membrana Plasmática “in situ”

*V Cervino<sup>1</sup> y G Benaim<sup>1</sup>.*

1. Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

#### RESUMEN

El etanol estimula de una manera aditiva con la calmodulina a la  $Ca^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática de eritrocitos humanos, por lo que esta enzima ha sido objeto de estudio con el fin de caracterizar el mecanismo de acción de este alcohol. Sin embargo, la mayoría de estos estudios han sido enfocados sobre la actividad de la enzima purificada en su forma soluble. Es importante poder extrapolar las evidencias obtenidas sobre dicha forma solubilizada y libre de fosfolípidos naturales a la enzima en su ambiente lipídico natural, con el fin de establecer la posible relevancia farmacológica de su efecto. En este trabajo evidenciamos que el efecto del etanol y otros alcoholes alifáticos de cadena corta como: metanol, n-propanol y n-butanol en la  $Ca^{2+}$ -ATPasa presente en fragmentos de membranas de eritrocitos humanos (fantasmas), es esencialmente idéntico al efecto reportado sobre la enzima purificada. También demostramos en este mismo sistema que la estimulación inducida por el etanol es reversible, al igual que ocurre “in vivo”. Por otra parte, similar a lo que se observa con la enzima purificada, en este trabajo evidenciamos que el fosfatidiletanol, un fosfolípido ácido que se acumula en la membrana plasmática luego de la ingesta de etanol, estimula la  $Ca^{2+}$ -ATPasa de fragmentos de membrana, incrementando la afinidad por  $Ca^{2+}$  a niveles superiores a los inducidos por calmodulina y por etanol. Se observó además un efecto aditivo sobre la afinidad por  $Ca^{2+}$  y la  $V_{max}$  de la enzima en presencia simultánea de etanol y fosfatidiletanol, lo cual permite postular que este efecto también podría ocurrir en la célula intacta.

Palabras Clave:  $Ca^{2+}$ -ATPasa, Etanol, Alcohol, Membrana, Fosfatidiletanol.

#### ABSTRACT

Ethanol and calmodulin additively stimulate the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes. Thus, this enzyme have been the subject of studies oriented to establish the mechanism of action of this alcohol. However, most of the efforts has been directed to the purified dissolved form of the calcium pump. It is relevant to be able to extrapolate the evidences obtained on this form, which is devoid of natural lipids, to the form on the intact membrane, in order to be able to establish the possible pharmacological relevance of this effect. In this work we show that the effect of ethanol and other short chain aliphatic alcohols as methanol, n-propanol and n-butanol, on the  $Ca^{2+}$ -ATPase present in plasma membrane fragments (ghosts) from human erythrocytes is essentially identical to that observed on the purified calcium pump. We also show in the same system that the stimulation obtained by ethanol is reversible, as it occurs «in vivo». On

the other hand, similar to the purified enzyme, in this work we show that phosphatidylethanol, an acidic phospholipid which is accumulated in the plasma membrane after alcohol ingestion, is able to stimulate the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase present in membrane fragments, increasing the affinity for  $\text{Ca}^{2+}$  to levels beyond those obtained in the presence of calmodulin and ethanol. It was also observed an additive effect on the enzyme affinity for  $\text{Ca}^{2+}$  and on the  $V_{\text{max}}$ , when both ethanol and phosphatidylethanol are simultaneously present, which allows us to postulate that this effect could occur on the intact cell.

Key Words:  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, Ethanol, Alcohol, Membrane, Phosphatidylethanol.

## INTRODUCCIÓN

La  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de membrana plasmática es la enzima responsable del mantenimiento de los niveles basales de calcio a largo plazo en las células eucariotas<sup>(1)</sup>. Esta enzima pertenece al grupo de ATPasas clasificadas como tipo «P», ya que forma un intermediario fosforilado a través de su ciclo catalítico. Una de sus características fundamentales es que es una enzima altamente regulada. La  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase es estimulada por Calmodulina (CaM)<sup>(2,3)</sup>, por fosfolípidos ácidos y ácidos grasos poli-insaturados<sup>(4)</sup>, mediante fosforilación de la enzima a través de la proteína quinasa dependiente de AMPc<sup>(5)</sup> y por la proteína quinasa C<sup>(6)</sup>. Esta enzima es estimulada también mediante proteólisis<sup>(7-9)</sup> y mediante autoagregación<sup>(10)</sup>. Solventes orgánicos como el dimetil sulfóxido, el glicerol y el etilenglicol también son capaces de estimular a la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase<sup>(11,12)</sup> simulando al efecto observado en presencia de CaM. Mas recientemente se ha reportado que el etanol es capaz de estimular a esta enzima<sup>(13)</sup>. El efecto estimulador inducido por este alcohol, tanto en la velocidad máxima como sobre la afinidad enzima por sus sustratos ( $\text{Ca}^{2+}$  y ATP), es mayor que el efecto observado en presencia de la CaM, siendo además aditivo con este último, lo cual demuestra que ambos efectores actúan a través de diferentes mecanismos<sup>(13)</sup>. El efecto estimulador de este alcohol es observado a concentraciones farmacológicas, lo cual sugiere posibles implicaciones de relevancia toxicológica. Otros alcoholes alifáticos de cadena corta como: metanol, n-propanol y n-butanol también son capaces de estimular la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de membrana plasmática, observándose una clara dependencia con respecto al largo de la cadena del alcohol. Así, mientras mayor es el número de carbonos, menor es la concentración necesaria del alcohol para obtener la máxima estimulación de la enzima, lo cual implica la importancia de interacciones hidrofóbicas en su efecto. Por otra parte, a nivel de las células hepáticas, la presencia de altas concentraciones de etanol en el organismo puede producir alteraciones en el sistema de señalización celular<sup>(14)</sup>, dando origen a la formación de otros elementos que no forman parte estructuralmente de la membrana plasmática en condiciones fisiológicas normales y que provocan variaciones en las propiedades físico-químicas de las mismas, así como en las interacciones con las proteínas de la membrana. Uno de estos productos es el fosfatidiletanol, el cual se acumula en la membrana como producto de la interacción del etanol con la fosfolipasa D, a través de un proceso de transfosfatidilación. El etanol, a concentraciones farmacológicas, es capaz de inducir cambios en la fluidez de la membrana por la incorporación de este fosfolípido<sup>(15)</sup>. Además el fosfatidil etanol se obtiene a partir de fosfatidilcolina, lo cual implica la transformación de un fosfolípido neutro en un fosfolípido ácido, lo cual es particularmente relevante en su efecto sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de la membrana plasmática. Los estudios del efecto del etanol y del fosfatidiletanol reportados previamente por nuestro laboratorio fueron realizados sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase purificada de eritrocitos humanos, haciéndose necesaria la extrapolación de los efectos observados en la enzima “in situ”, con el fin de tratar de establecer la posible relevancia farmacológica de este efecto. En este trabajo nos propusimos profundizar en la caracterización del efecto del etanol, el fosfatidiletanol y otros alcoholes alifáticos e cadena corta sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de la membrana plasmática “in situ”, utilizando para ello la enzima en su ambiente lipídico natural.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Reactivos

Todos los reactivos fueron obtenidos con el mayor grado de pureza disponible. ATP, EGTA, fosfatidilcolina, fueron obtenidos de Sigma. El fosfatidiletanol fue adquirido de Avanti-Polar Lipids.

#### Obtención de fantasmas de eritrocitos libres de calmodulina

Los fantasmas se obtuvieron siguiendo la metodología descrita por Niggli y col.<sup>(16)</sup>. 1 lt de sangre humana recién vencida, fue lavada 2 veces con un medio isotónico que contenía 10 mM Tris-HCl (pH 7.4) y 130 mM KCl centrifugando a 5800 x g durante 10 min. y a 4°C. El plasma y los glóbulos blancos fueron removidos mediante succión y los eritrocitos fueron hemolizados en 10 volúmenes de una solución hipotónica que contenía 1 mM EDTA y 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), centrifugando 2 veces a 21.000 x g a 4°C durante 50 min. Los fantasmas de eritrocitos obtenidos en este paso, fueron lavados con 10 mM Hepes (pH 7.4) centrifugando a 21.000 x g durante 40 min. y a 4°C, 2 veces o hasta eliminar la mayor cantidad de hemoglobina. Finalmente los fantasmas fueron lavados con un medio isotónico que contenía 10 mM Hepes (pH 7.4), 130 mM KCl, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> y 50 mM CaCl<sub>2</sub> centrifugando bajo las mismas condiciones anteriores. Estos fantasmas fueron resuspendidos en la solución isotónica anterior y guardados a -70°C hasta su utilización.

#### Determinación de la actividad de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa

La actividad hidrolítica de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa en los fantasmas de eritrocitos se determinó mediante la cuantificación de Pi, siguiendo el procedimiento descrito por Fiske y Subbarow<sup>(17)</sup>, utilizando sulfato ferroso como agente reductor<sup>(18)</sup>. Aproximadamente 0.5 mg/ml de fantasmas se incubaron durante 45 min. a 37°C en un volumen final de 250 ml de un buffer que contenía 20 mM Hepes (pH 7.4), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 130 mM KCl, 2 mM ATP, 2 mM ouabaina y diferentes concentraciones de CaCl<sub>2</sub> para obtener la concentración de Ca<sup>2+</sup> libre deseada. La concentración de Ca<sup>2+</sup> libre fue calculada utilizando un programa computarizado originalmente descrito por Fabiato y Fabiato<sup>(19)</sup> utilizando las constantes de Swarzenbach<sup>(20)</sup>. Los diferentes moduladores estudiados tales como etanol, metanol, n-propanol, n-butanol, calmodulina y fosfatidiletanol fueron añadidos en el medio de reacción, a las concentraciones indicadas en los gráficos. La reacción se detuvo con 250 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 16% v/v a 4°C. Las muestras fueron centrifugadas durante 2 min. en una centrifuga «eppendorf» y el sobrenadante fue utilizado para determinar la cantidad de Pi liberado producto de la hidrólisis de ATP por la bomba. Cuando fue necesario, se prepararon blancos apropiados para corregir la ligera interferencia de las altas concentraciones de los alcoholes con el método colorimétrico. La actividad fue expresada como nmoles de Pi liberado por minuto por mg de proteína. Las figuras muestran el valor promedio de al menos 6 experimentos independientes.

#### Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas fue determinada siguiendo el método de Lowry y col., 1951<sup>(21)</sup> con las modificaciones introducidas por Bensadoun y Weinstein<sup>(22)</sup>.

## RESULTADOS

#### Efecto del etanol y otros alcoholes alifáticos de cadena corta sobre la actividad de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de fragmentos de membrana de eritrocitos humanos

Con el objetivo de extrapolar los efectos observados en la enzima purificada<sup>(13)</sup>, sobre la enzima en su ambiente lipídico natural, se determinó el efecto de este alcohol y otros alcoholes alifáticos de cadena corta como: metanol, n-propanol y n-butanol sobre la actividad hidrolítica de ATP de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa en fragmentos de membrana de eritrocitos humanos. Como se muestra en la [figura 1](#), tanto el etanol como los otros alcoholes alifáticos de cadena corta estimularon la actividad de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa “in situ”, observándose que estos alcoholes son capaces de estimular a la enzima en una mayor proporción a la estimulación obtenida con calmodulina (aprox. 2.4 veces en lugar de 2 veces). La velocidad máxima de la enzima alcanzada fue similar

independientemente del alcohol utilizado (Fig. 1). Sin embargo, a medida que aumenta el largo de la cadena carbonada del alcohol, la concentración del mismo necesaria para alcanzar la máxima estimulación fue menor, tanto en presencia como en ausencia de CaM. Independientemente del alcohol utilizado el efecto estimulador del etanol fue siempre aditivo con el de la CaM, alcanzándose una  $V_{max}$  3 veces mayor con respecto a la actividad basal cuando el alcohol y la CaM se encuentran presentes simultáneamente en el medio de reacción. Al Igual que con la enzima purificada<sup>(13)</sup>, la respuesta de la enzima a los diferentes alcoholes es bifásica. En este sentido, la concentración del n-alcohol necesaria para inhibir la actividad  $Ca^{2+}$ -ATPasa a un 50% de su valor máximo disminuye a medida que el largo de la cadena carbonada del alcohol incrementa, independientemente de la presencia o no de CaM (Fig 1).

Figura 1: Efecto del etanol y otros alcoholes alifáticos de cadena corta sobre la actividad de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa en fragmentos de membrana plasmática

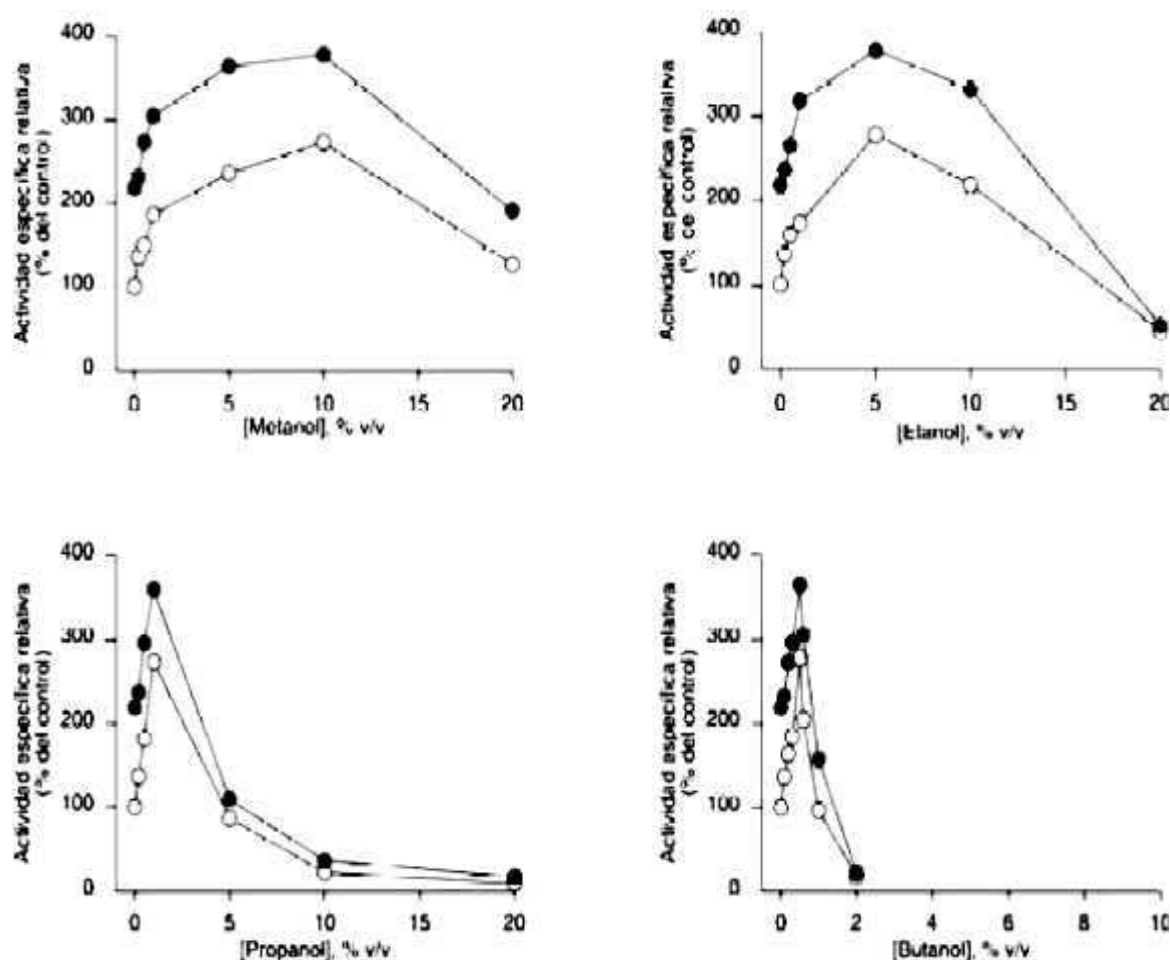


Figura 1: Efecto del etanol y otros alcoholes alifáticos de cadena corta sobre la actividad de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa en fragmentos de membrana plasmática

El medio de reacción contiene 130 mM KCl, 20 mM Hepes KOH (pH 7.2), 2 mM ATP, 1 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EGTA, 2 mM ouabaina y la cantidad de  $CaCl_2$  necesario para obtener una concentración de  $Ca^{2+}$  final de 10 mM. La enzima fue incubada durante 45 min a  $37^\circ C$ , en presencia de las concentraciones (v/v) del n-alcohol respectivo indicado, tanto en ausencia ( $\circ$ ) como en presencia de 5 mg/ml de calmodulina ( $\bullet$ ). La reacción fue detenida, mediante la adición de TCA frío (8% final/v) y la concentración de  $P_i$  fue determinada como fue explicado en el la swección de Materiales y Métodos. Los resultados representan la media de al menos 6 experimentos independientes.

Efecto del fosfatidiletanol sobre la actividad de la  $Ca^{2+}$ -ATPasa de fragmentos de membrana de eritrocitos humanos

Como se mencionó anteriormente, la ingesta de etanol conlleva la producción de un fosfolípido ácido como es el fosfatidiletanol, el cual puede inducir ciertas perturbaciones a nivel de la

membrana celular. Con el objetivo de estudiar el efecto de este fosfolípido sobre la actividad de la enzima en su ambiente lipídico natural y comparar dicho efecto con el ya reportado sobre esta enzima purificada<sup>(23)</sup>, se estudió el efecto del fosfatidiletanol sobre la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa en fragmentos de membranas. En la [figura 2](#) se muestra una curva dosis-respuesta, donde se puede observar la actividad hidrolítica de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa en fragmentos de membrana en presencia de concentraciones crecientes de fosfatidiletanol, tanto en ausencia como en presencia de etanol. Como puede observarse, la enzima fue estimulada por el fosfatidiletanol, presentando su máxima estimulación a una concentración del fosfolípido de 100 mg/ml tanto en ausencia como en presencia de etanol. Por encima de esta concentración la actividad de la enzima comienza a disminuir paulatinamente. Igualmente puede observarse en esta gráfica que el fosfatidiletanol y el etanol presentan un efecto estimulador aditivo sobre la enzima ([Fig. 2](#)).

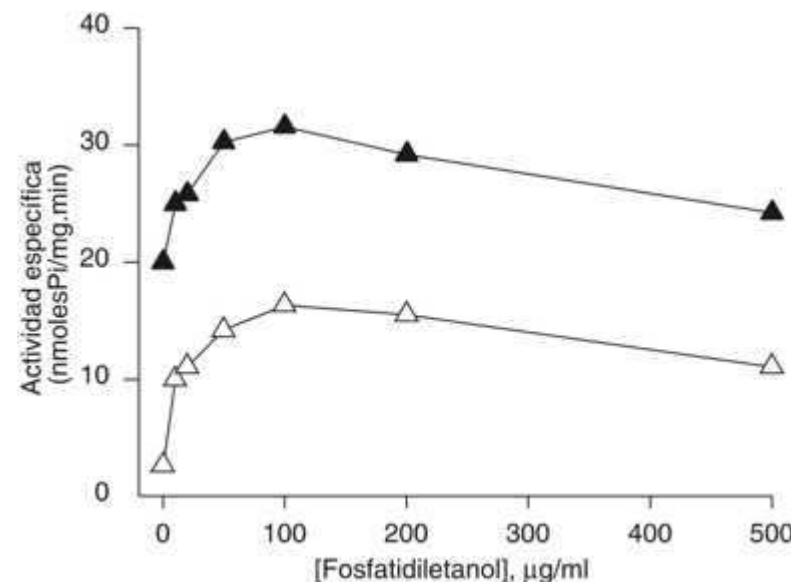


Figura 2: Efecto de concentraciones crecientes de fosfatidiletanol sobre la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de fragmentos de membrana

Las condiciones experimentales fueron las mismas mostradas en la Fig. 1. La concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre utilizado fue 10 mM. Control (Δ); 5% (v/v) etanol (▲). Los resultados corresponden al promedio de al menos 6 experimentos independientes.

Tomando en cuenta que los fosfolípidos ácidos además de aumentar la  $V_{\text{max}}$ , también incrementan la afinidad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa por el  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>(4)</sup>, se estudió el efecto producido por el fosfatidiletanol sobre la  $V_{\text{max}}$  y la afinidad de la enzima por este catión. La [Figura 3](#) muestra la actividad específica de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa en fragmentos de membrana, obtenida en función de concentraciones crecientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , tanto en presencia de fosfatidiletanol (100 mg/ml), como de CaM y también en presencia simultáneamente de fosfatidiletanol y calmodulina. Como puede observarse en la [figura 3](#), al igual que otros fosfolípidos ácidos<sup>(24)</sup>, el fosfatidiletanol aumenta la afinidad de la enzima por el calcio ( $K_m$   $0.267 \pm 0.040$  mM), siendo la afinidad de la enzima en su condición basal  $0.796 \pm 0.062$  mM. La afinidad observada en presencia del fosfatidiletanol fue mayor a la obtenida en presencia de CaM ( $0.421 \pm 0.008$  mM). Sin embargo la enzima alcanzó la misma  $V_{\text{max}}$  tanto en presencia de CaM ( $27 \pm 2$  nmolesPi/mg.min) como en presencia de fosfatidiletanol ( $29 \pm 3$  nmolesPi/mg.min). Asimismo, pudo observarse un efecto aditivo sobre la afinidad de la enzima por el calcio ( $K_m$   $0.191 \pm 0.018$  mM) cuando la CaM y el fosfatidiletanol se encontraban presentes simultáneamente en el medio de reacción, manteniéndose sin embargo, la misma  $V_{\text{max}}$  ( $30 \pm 2$  nmoles Pi/mg.min).

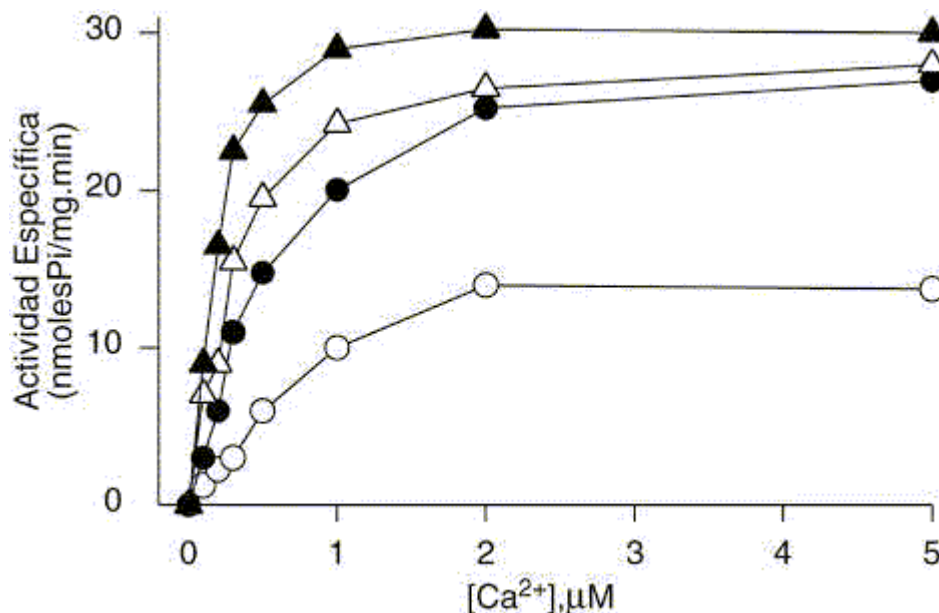


Figura 3: Efecto del fosfatidiletanol y la CaM sobre la actividad de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de fragmentos de membrana

Las condiciones experimentales fueron las mismas mostradas en la Fig. 1. Control (○); 5 mg/ml CaM (●); 100 mg/ml fosfatidiletanol (Δ) y en presencia de CaM y fosfatidiletanol simultáneamente (▲). Los resultados corresponden al promedio de al menos 6 experimentos independientes.

Tomando en cuenta la importancia del efecto del etanol sobre la actividad de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de membrana plasmática y conociendo la participación de este alcohol en la formación del fosfatidiletanol, estudiamos el efecto del etanol y el fosfatidiletanol sobre la actividad específica de esta enzima en su ambiente lipídico natural. En la Fig. 4 se muestra la actividad específica de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa en fragmentos de membrana, obtenida en función de concentraciones crecientes de Ca<sup>2+</sup>, en presencia de fosfatidiletanol (100 mg/ml), de etanol (5%) y en presencia simultáneamente de fosfatidiletanol y etanol. Como se observó en la Fig. 2, este fosfolípido incrementó la afinidad de esta enzima por el Ca<sup>2+</sup> por encima a la estimulación obtenida en presencia de la CaM, sin producir ninguna diferencia en la V<sub>max</sub> de la enzima entre ambos efectores. Sin embargo, el etanol incrementó tanto la V<sub>max</sub> como la afinidad de la enzima por el Ca<sup>2+</sup>, superando los valores obtenidos en presencia de CaM (Fig. 4). Así, puede observarse que el etanol incrementó la V<sub>max</sub> de la enzima (34 ± 3 nmoles Pi/mg.min), por encima a la obtenida con el fosfatidiletanol (29 ± 3 nmoles Pi/mg.min). La afinidad de la enzima por el Ca<sup>2+</sup> también se ve significativamente incrementada en presencia del fosfatidiletanol (K<sub>m</sub>= 0.267 ± 0.040 mM) con respecto al etanol (K<sub>m</sub>= 0.381 ± 0.009 mM). Asimismo, la adición simultánea de etanol y fosfatidiletanol produce un incremento significativo tanto sobre la V<sub>max</sub> de la enzima (41 ± 3 nmoles Pi/mg.min) como sobre la afinidad de la misma por el Ca<sup>2+</sup> (K<sub>m</sub>= 0.190 ± 0.009 mM).

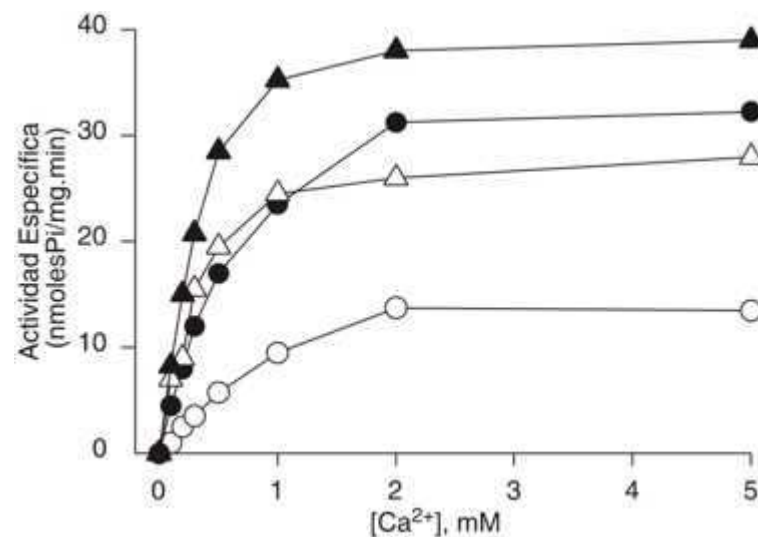
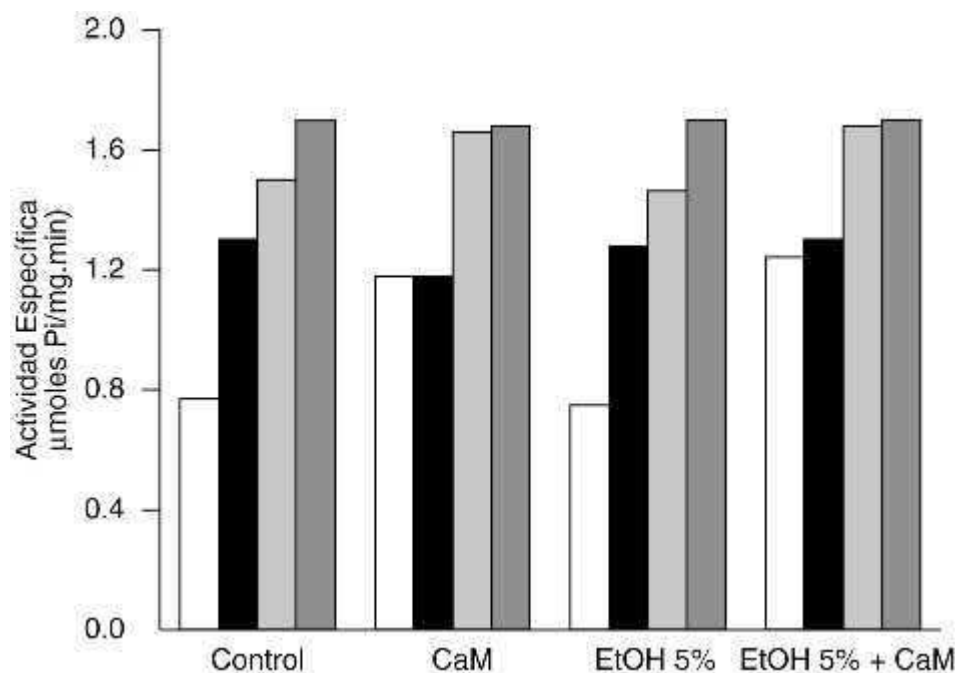


Figura 4: Efecto del fosfatidiletanol y el etanol sobre la actividad de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de fragmentos de membrana

Las condiciones experimentales fueron las mismas mostradas en la Fig. 1. Control (○); en presencia de 5% v/v etanol (●); en presencia de 100 mg/ml fosfatidiletanol (△) y en presencia de 5% (v/v) etanol y 100 mg/ml fosfatidiletanol simultáneamente (▲). Los resultados corresponden al promedio de al menos 6 experimentos independientes.

#### Reversibilidad del efecto del etanol

Con el objetivo de determinar si el efecto del etanol sobre la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de membrana plasmática de eritrocitos es reversible, se preincubaron las membranas de eritrocitos con CaM, etanol o etanol + CaM simultáneamente y se ensayó la reversibilidad de cada uno de estos moduladores, lavando las membranas 3 veces, mediante centrifugaciones sucesivas y determinando posteriormente su actividad específica en presencia de los mismos moduladores mencionados. Como puede observarse en la [Figura 5](#) el efecto estimulador inducido por la CaM fue irreversible, obteniéndose la misma actividad tanto antes como después de lavar las membranas previamente preincubadas con el modulador proteico ([Figura 5](#)). Sin embargo, el efecto estimulador del etanol si mostró ser totalmente reversible. Como puede observarse en la [Figura 5](#), las membranas preincubadas con etanol y posteriormente lavadas mostraron la misma actividad basal y estimulación por el etanol que las membranas que no fueron pre-incubadas con el alcohol. Experimentos controles demostraron que la actividad de la enzima no es afectada por el tratamiento de lavado al cual fueron sometidas las proteínas (datos no mostrados).



## Figura 5: Reversibilidad del efecto del etanol

Las membranas fueron preincubadas con 5 mg/ml de CaM, 5% v/v etanol y con 5 mg/ml CaM + 5% v/v etanol simultáneamente durante 10 min, después de los cuales las membranas fueron lavadas, centrifugando 3 veces y posteriormente se determinó su actividad en presencia de los diferentes moduladores, como se explica en la sección de Materiales y Métodos. Las barras de cada bloque muestra la actividad basal (barras blancas); en presencia de 5 mg/ml CaM (barras negras); en presencia de 5% v/v etanol (barra con líneas oblicuas) y en presencia de CaM y etanol simultáneamente (barra con líneas horizontales). Los bloques representan las membranas no preincubadas (A); las membranas preincubadas con CaM (B); las membranas preincubadas con etanol (C) y las membranas preincubadas con etanol y CaM simultáneamente (D) Los resultados corresponden al promedio de 5 experimentos independientes.

## DISCUSIÓN

La  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática, probablemente por su función esencial como enzima reguladora de la concentración citoplasmática basal de  $\text{Ca}^{2+}$ , es una enzima que está sometida a un alto nivel de regulación. Se han reportado un gran número de moduladores de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa además de la CaM, todos ellos capaces de estimular tanto la actividad hidrolítica de la enzima como el transporte de calcio asociado. Algunos de estos moduladores incrementan únicamente la afinidad de la enzima por el  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>(25)</sup>, mientras que otros incrementan la  $V_{\text{max}}$  o ambos<sup>(25,26)</sup>. Sin embargo, la mayoría de los moduladores reportados sólo incrementan la actividad de esta enzima hasta niveles similares a los reportados en presencia de la CaM. En nuestro laboratorio demostramos que el etanol y otros alcoholes alifáticos de cadena corta son capaces de estimular la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa purificada de eritrocitos humanos incrementando tanto su  $V_{\text{max}}$  como su afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$  y por el ATP. A diferencia de otros moduladores, la estimulación obtenida en presencia de etanol fue mayor a la reportada en presencia de CaM y aditiva con dicho modulador proteico<sup>(13)</sup>. Este efecto aditivo sugiere un mecanismo de acción diferente para el etanol y la CaM. En este trabajo demostramos que el efecto estimulador del etanol sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa es extensible a la enzima en su ambiente lipídico natural. Lo mismo puede decirse del efecto de otros alcoholes alifáticos de cadena corta como el metanol, n-propanol y n-butanol, encontrándose que mientras mayor es el número de carbonos de la cadena del alcohol menor es la concentración de alcohol necesaria para alcanzar el máximo efecto estimulador. Las interacciones hidrofóbicas se conocen que afectan la actividad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática<sup>(11)</sup>. El hecho que haya una dependencia entre el largo de la cadena hidrocarbonada del alcohol y la concentración del mismo necesaria para alcanzar el máximo efecto estimulador podría ser fácilmente interpretado como un efecto hidrofóbico relacionado con el coeficiente de partición del alcohol entre el agua y la membrana. Por lo tanto, el efecto estimulador observado podría ser debido a un incremento en la fluidez de la membrana. Sin embargo, los resultados observados en este trabajo utilizando la enzima en su ambiente lipídico natural se correlacionan muy bien con los resultados reportados por Benaim y col., en 1994 sobre la enzima purificada, indicando que el efecto del alcohol observado podría ser mas bien un efecto directo sobre la proteína y no por cambios en las propiedades del entorno lipídico de la misma<sup>(13)</sup>. Esto es apoyado por experimentos recientes en los cuales hemos tratado de identificar el dominio de interacción del etanol con la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa<sup>(27)</sup>. Experimentos realizados sobre diferentes isoformas y formas truncadas de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa expresadas en células Sf9, nos permitieron demostrar que el etanol ejerce su efecto al interactuar con una región de 95 aminoácidos hacia el extremo C-terminal de la proteína.

Es importante resaltar que en este trabajo demostramos que el etanol fue capaz de estimular a la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa en su condición natural a concentraciones farmacológicas (0.25-0.5% v/v etanol), es decir, concentraciones del alcohol fácilmente alcanzables en la sangre después de un consumo agudo del mismo. Estos resultados son esencialmente idénticos a los obtenidos en estudios con la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa purificada<sup>(13)</sup>. En este mismo sentido, experimentos realizados sobre diferentes isoformas de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de membrana plasmática, expresadas en células Sf9, las cuales son tejido-específico y presentan algunas diferencias estructurales y funcionales mostraron que las mismas son diferencialmente estimuladas por el etanol. Así, la concentración de etanol necesaria para inducir el máximo efecto estimulador fue diferente para cada isoforma. Interesantemente, la



isoforma que se expresa únicamente en células nerviosas (PMCA2) alcanzó su máxima estimulación a una concentración de etanol 10 veces menor (0.25-0,5%) a la que se observa en eritrocitos humanos (5%), los cuales poseen las isoformas PMCA1 y PMCA4. El efecto del etanol sobre la actividad de hidrólisis de ATP por la enzima es extensible al transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  asociado a la bomba<sup>(13)</sup>. Estos resultados tomados en conjunto, complementados con los obtenidos en este estudio utilizando membranas de eritrocitos humanos, sugieren una posible relevancia toxicológica del efecto del etanol sobre la enzima “in vivo”. Esto es apoyado si tomamos en cuenta la reversibilidad del efecto del etanol observado en este trabajo, lo cual concuerda con el efecto reversible ocasionado por este alcohol “in vivo”.

La acumulación de fosfatidiletanol producto de la interacción del etanol con la fosfolipasa D puede inducir cambios en la fluidez de la bicapa y por lo tanto alterar el funcionamiento de las proteínas de membrana<sup>(15)</sup>. Específicamente, la presencia de etanol en la membrana conlleva a la transformación de un fosfolípido neutro como es la fosfatidilcolina en un fosfolípido ácido como el fosfatidiletanol, lo cual es particularmente relevante en su efecto sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática. Hay que recordar que los fosfolípidos neutros no tienen ningún efecto sobre la actividad de esta enzima mientras que los fosfolípidos ácidos estimulan a la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa incrementando tanto su  $V_{\text{max}}$  como su afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>(24)</sup>. Asimismo, este alcohol induce una estimulación de la fosfolipasa D<sup>(14,28)</sup>, favoreciendo aún más la acumulación de fosfatidiletanol en las membranas. Este fosfolípido es difícilmente degradado y se acumula de una manera importante en la membrana, luego de una ingesta alcohólica.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el fosfatidiletanol tiene un comportamiento similar al de otros fosfolípidos ácidos como por ejemplo, la fosfatidilserina<sup>(23)</sup>. La fosfatidilserina y otros fosfolípidos ácidos incrementan la afinidad de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa por el  $\text{Ca}^{2+}$  a niveles superiores al incremento inducido por la CaM<sup>(24)</sup>. Como muestran los resultados obtenidos en este trabajo, utilizando la enzima en su ambiente lipídico natural, el fosfatidiletanol también estimula la afinidad de la enzima por el  $\text{Ca}^{2+}$  a niveles mayores al incremento obtenido en presencia de CaM. Sin embargo, a diferencia de la fosfatidilserina y otros fosfolípidos ácidos, el fosfatidiletanol mostró un efecto estimulador aditivo a la estimulación obtenida en presencia de CaM sobre la afinidad de la enzima por dicho catión e igualmente su efecto estimulador fue aditivo con el efecto inducido por el etanol tanto sobre la  $V_{\text{max}}$  como sobre la afinidad por el  $\text{Ca}^{2+}$ . Cuando se compara la estructura del fosfatidiletanol con la fosfatidilserina, se puede observar que aún cuando ambos son fosfolípidos ácidos con una carga neta negativa, la fosfatidilserina tiene 2 cargas negativas y una positiva, mientras que el fosfatidiletanol posee una sola carga negativa, presentando además este último una cabeza polar mas pequeña y sencilla, lo cual podría garantizar una mayor accesibilidad de este fosfolípido a ciertos dominios importantes de la enzima. Es interesante que estos mismos resultados fueron observados previamente sobre la enzima purificada de eritrocitos humanos mediante un proceso de solubilización con detergente en presencia de fosfatidilcolina<sup>(23)</sup>. El hecho que el efecto del etanol y el fosfatidiletanol sea esencialmente el mismo en la enzima purificada y en membranas de eritrocitos humanos, permite apoyar que el mecanismo de acción de este alcohol no está relacionado con las perturbaciones ocasionadas a nivel de la membrana plasmática, sino que deben ejercer su efecto directamente sobre la enzima.

Los resultados reportados en el presente trabajo permiten sugerir que el efecto del etanol sobre la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa podría ser una combinación de un efecto directo sobre la proteína y uno indirecto, producto de la acumulación de fosfatidiletanol en la membrana plasmática, lo cual conllevaría una doble estimulación de la actividad de la enzima. Esto podría ser mas relevante aún, si tomamos en cuenta el efecto aditivo del fosfatidiletanol con respecto a la CaM y al etanol en cuanto al incremento en la afinidad de la enzima por el  $\text{Ca}^{2+}$ . Un menor  $K_m$  para el  $\text{Ca}^{2+}$  le permitiría a la bomba extraer  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula a una concentración mas baja de este catión, con lo que se alcanzaría una menor concentración citosólica, con consecuencias directas sobre los mecanismos de transmisión de señales relacionados con este segundo mensajero.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el CONICIT S1-99000058 y el C.D.C.H C-03-33-4798/00 a

G.B. y por CONICIT pasantía post-doctoral 1903 a V.C.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carafoli E. Intracellular Calcium Homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* 1987; 56: 395-433.
2. Gopinath RM y Vincenzi FF. Phosphodiesterase Protein Activator Mimics Red Blood Cell Cytoplasmic Activator of the  $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977; 7: 1203-1209.
3. Jarret HW y Penniston JT. Partial Purification of the  $(Ca^{2+}+Mg^{2+})$ -ATPase Activator from Human Erythrocytes: Its Similarity to the Activator 3'-5' Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1977; 77: 1210-1216.
4. Niggli V, Adunyah ES y Carafoli E. Acidic Phospholipids, Unsaturated Fatty Acids, and Limited Proteolysis Mimic the Effect of Calmodulin on the Purified Erythrocyte  $Ca^{2+}$ -ATPase. *J. Biol. Chem.* 1981; 256: 8588-8592.
5. Neyses L, Reinlib L y Carafoli E. Phosphorylation of the  $Ca^{2+}$  Pumping ATPase of Heart Sarcolemma and Erythrocyte Plasma Membrane by the cAMP-Dependent Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* 1985; 260: 10283-10287.
6. Smallwood JI, Gugi B y Rasmussen H. Regulation of Erythrocyte  $Ca^{2+}$  Pump Activity by Protein Kinase C. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 2195-2202.
7. Benaim G, Zurini M y Carafoli E. Different Conformational States of Purified  $Ca^{2+}$ -ATPase of the Erythrocyte Plasma Membrane Revealed by Controlled Trypsin Proteolysis. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 8471-8477.
8. Benaim G, Clark A y Carafoli E. ATPase Activity and  $Ca^{2+}$  Transport by Reconstituted Tryptic Fragments of Calcium Pump of Erythrocyte Plasma Membranes». *Cell Calcium.* 1986; 7: 175-186.
9. Wang KKW, Villalobo A y Roufogalis BD. Activation of the  $Ca^{2+}$ -ATPase of Human Erythrocyte Membrane by an Endogenous  $Ca^{2+}$ -Dependent Neutral Protease. *Arch. Biochem. Biophys.* 1988; 260: 696-704.
10. Kosk-Kosicka D y Bzdega T. Activation of the Erythrocyte  $Ca^{2+}$ -ATPase by Either Self-Association or Interaction with Calmodulin. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 18184-18189.
11. Benaim G y de Meis L. Activation of the Purified Erythrocyte Plasma membrane  $Ca^{2+}$ -ATPase by Organic Solvents. *FEBS Lett.* 1989; 244: 484-486.
12. Benaim G y de Meis L. Similarities between the Effects of Dimethyl Sulfoxide and Calmodulin on the Red Cell  $Ca^{2+}$ -ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1990; 1026: 87-92.
13. Benaim G, Cervino V, Lopez-Estraño C y Weitzman C. Ethanol Stimulate the Plasma Membrane Calcium Pump from Human Erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1994; 1195: 141-148.
14. Hoek JB, Thomas AP, Rooney TA, Higashi K y Rubin E. Ethanol and Signal Transduction in the Liver. *FASEB J.* 1992; 6: 2386-2396.
15. Taraschi TF y Rubin E. Biology of Disease. Effects of Ethanol on the Chemical and Structural Properties of Biologic Membranes. *Laboratory Investigation.* 1985; 52: 120-131.
16. Niggli V, Zurini M y Carafoli E. Purification, Reconstitution and Molecular Characterization of the  $Ca^{2+}$  Pump of Plasma Membranes. *Methods in Enzymology.* 1987; 139: 791-808.

17. Fiske CH y Subbarow Y. The Colorimetric Determination of Phosphorus. *J. Biol. Chem.* 1925; 66: 375-400.
18. Benaim G y Romero PJ. A Calcium Pump in Plasma Membrane Vesicles from *Leishmania braziliensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1990; 1027: 79-84.
19. Fabiato A y Fabiato FJ. Calculator Programs for Computing the Composition of the Solutions Containing Multiple Metals and Ligands Used for Experiments in Skinned Muscle Cells. *J. Physiol. (Paris)*. 1979; 75: 463-505.
20. Benaim G, Losada S, Gadelha FR y Docampo R. «A Calmodulin-Activated (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase is Involved in Ca<sup>2+</sup> Transport by Plasma Membrane Vesicles from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 1991; 280: 715-720.
21. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
22. Bensadoun A y Weinstein D. Assay of Proteins in the Presence of Interfering Materials. *Anal. Biochem.* 1976; 70: 241-250.
23. Sujú M, Dávila M, Poleo G, Docampo R y Benaim G. Phosphatidylethanol Stimulate the Plasma Membrane Calcium Pump from Human Erythrocytes. *Biochem. J.* 1996; 317: 933-938.
24. Filoteo AG, Gorski JP y Penniston JT. The ATP-Binding Site of the Erythrocyte Membrane Ca<sup>2+</sup> Pump. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 6526-6530.
25. Carafoli E. Calcium Pump of the Plasma Membrane. *Physiol. Rev.* 1991; 71: 129-153.
26. Rega AF y Garrahan PJ. In the Ca<sup>2+</sup> Pump of Plasma Membranes (Rega, AF y Garrahan PJ, eds.), CRC Press, Boca Raton., 1986.
27. Cervino V, Benaim G, Carafoli E y Guerini D. The effect of ethanol on the plasma membrane calcium pump is isoform-specific. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 29811-29815.
28. Billah M y Anthes J. The Regulation and Cellular Functions of Phosphatidylcholine Hydrolysis. *Biochem. J.* 1990; 269: 281-291.

---

© **2011 Sociedad Venezolana de Farmacología y Farmacología Clínica y Terapéutica.**

**Universidad Central de Venezuela. Facultad de Medicina. Comisión de Publicaciones de la Facultad de Medicina, Edificio del Decanato, Oficina 50 P.B.**



[veloscom@cantv.net](mailto:veloscom@cantv.net)