

Artículos

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 controlan el estado de ánimo.



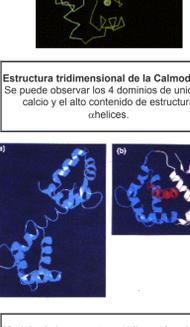
Gustavo Benaim  
 Biólogo Celular

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

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 inducen el efecto estimulador de la CaM (3, 4, 6), lo cual sugiere que también actúan removiendo la mencionada compuerta agarosa (1), de la cual se eleva al quitar el calcio del medio.

La bomba del calcio

La bomba de calcio (o Ca<sup>2+</sup>-ATPasa) de la membrana plasmática se ha reconocido como la enzima fundamental en la regulación de la concentración citoplasmática basal de este catión. La Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática es estimulada por calmodulina (CaM), su modificador proteico natural (Fig.1), fosfolípidos ácidos y ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga (15). También puede ser estimulada mediante fosforilación por la proteína-quinasa A y por la proteína-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 (Ca<sup>2+</sup> y ATP) al sitio activo (2, 12, 13).



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.

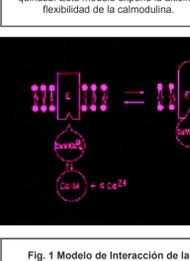


Fig. 1 Modelo de Interacción de la calmodulina con la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa en presencia de Ca<sup>2+</sup>. El modelo destaca que la interacción es directa, lo cual permite la purificación de la enzima mediante una columna de afinidad con calmodulina-agarosa.

Tomando en cuenta que la interacción de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa con la CaM es directa, la enzima puede ser purificada a homogeneidad a partir de membranas aisladas 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 eleva al quitar el calcio del medio.



Fig 2. Modelo de Interacción de distintos efectores sobre la Ca<sup>2+</sup>-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, el resultado es la misma: Un incremento en la accesibilidad de los sustratos

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

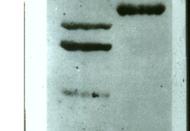


Fig. 4.-Efecto del etanol, calmodulina y proteólisis parcial sobre la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa purificada de eritrocitos humanos. La actividad enzimática es expresada en unidades de ATP hidrolizado por mg de Proteína por minuto. Control (O), Calmodulina (●); Etanol (▲); Etanol plus calmodulina (▲); Ca<sup>2+</sup>-ATPasa tripsinizada (D), Ca<sup>2+</sup>-ATPasa tripsinizada plus etanol (■).

El mecanismo de acción del alcohol es distinto al de la calmodulina, modificador 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 Ca<sup>2+</sup> y ATP (8). El efecto del etanol sobre la Ca<sup>2+</sup>-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 Ca<sup>2+</sup>-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 Ca<sup>2+</sup>-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 Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática es una enzima, que además de ser ubicua en células eucarióticas (15), está bastante conservada evolutivamente (7, 9, 10).

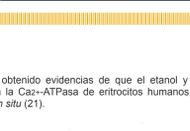


Fig. 3 Electroforesis en gel de poliacrilamida del producto de elución de la columna de afinidad de calmodulina-agarosa luego de la quelación del Ca<sup>2+</sup> con EGTA. El gel muestra una banda única de 140.000 Da., correspondiente a la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa. A la izquierda, las bandas corresponden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

Efectos del etanol

Recientemente hemos obtenido evidencias de que el etanol y otros alcoholes alifáticos de cadena corta estimulan la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de eritrocitos humanos, tanto en su forma purificada como sobre la enzima *in situ* (21).

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 de la Ca<sup>2+</sup>-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 expresadas de manera diferencial en los distintos tejidos. Las isoformas hPMCA1b y hPMCA4b se encuentran expresadas en las membranas de todas las células eucariotas 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 activo 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 estimulador. En este sentido, fue muy interesante observar que la isoforma más sensible al etanol es la hPMCA2g, la cual está ubicada fundamentalmente en cerebro 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 el 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 Ca<sup>2+</sup> 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 particularmente factible, y merece ser investigada con detalle.

Estimulación

Otros resultados más recientes de nuestro laboratorio, han demostrado que el fosfatidiletanol es capaz de estimular la actividad de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa a niveles mayores que otros fosfolípidos naturales (23).

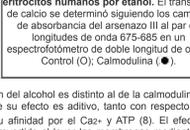


Fig. 6 Efecto del fosfatidiletanol y otros fosfolípidos ácidos sobre la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa purificada de eritrocitos humanos. Se puede observar el efecto activo del fosfatidiletanol y otros fosfolípidos ácidos sobre el efecto del etanol. C: Control; E: Etanol; P-eth: fosfatidiletanol; P-but: fosfatidilbutanol; PS: fosfatidilserina

Este efecto es interesante, ya que este fosfolípido se acumula en la membrana mediante un proceso de transfosfatilación 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 la estimulación de la actividad de la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa podría deberse a la acumulación en la membrana del fosfatidiletanol (2). Los hallazgos anteriores nos permiten postular que la combinación del etanol con el fosfatidiletanol formado a partir de éste podría tener un efecto sinérgico sobre la activación de la Ca<sup>2+</sup>-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 de la Ca<sup>2+</sup>-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 expresadas de manera diferencial en los distintos tejidos. Las isoformas hPMCA1b y hPMCA4b se encuentran expresadas en las membranas de todas las células eucariotas 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 activo 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 estimulador. En este sentido, fue muy interesante observar que la isoforma más sensible al etanol es la hPMCA2g, la cual está ubicada fundamentalmente en cerebro 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 el 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.

Mecanismo de acción

En otro orden de ideas, recientemente también hemos adelantado el estudio de la identificación del sitio de interacción de la bomba de calcio con el etanol. Durante el efecto del etanol sobre las diferentes isoformas de la Ca<sup>2+</sup>-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 de la proteína, mientras que la otra forma presenta una truncación de 139 aminoácidos (hPMCA4bΔ139) 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 hPMCA4bΔ44 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 hPMCA4bΔ139 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.

Efectores 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 decimos identificar la posible existencia de estos efectores naturales. Entre los candidatos que decidimos estudiar, tomando en cuenta los compuestos itaco-quinicos 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 conlleva a la hidrólisis del precursor fosfatidil inositol 4,5, -bisfosfato (11). Resultados recientes de nuestro laboratorio demuestran que este mensajero estimula a la Ca<sup>2+</sup>-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 conlleva a la entrada de calcio, por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico estimulando la fosfolipasa C γ 1, paralelamente a la liberación de calcio producto de la producción de Inositol (1,4,5) tris-fosfato (IP<sub>3</sub>), el diacil glicerol recién formado, además de estimular la proteína quinasa C, estimularía a la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa, aditivamente a la fosfolipasa C y 1 por un agonista apropiado, esto es, la elevación rápida pero transitoria de la concentración citoplasmática de Ca<sup>2+</sup>, regresando así a su nivel basal preparado para responder a otro nuevo estímulo. Aunque este modelo es aún especulativo, representa un punto de partida interesante para el entendimiento de la complejidad involucrada en los procesos de señalización celular.

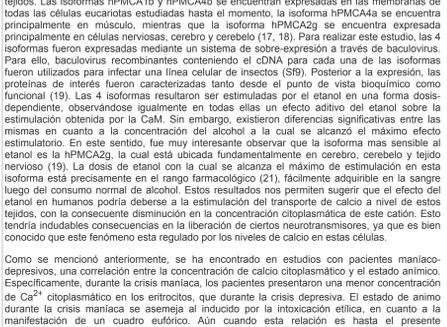


Fig. 7 Modelo de interacción del diacilglicerol y la calmodulina con la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática, luego de la elevación de la concentración intracelular del Ca<sup>2+</sup> a través de una estimulación extracelular.

Referencias

- Benaim, G., Zurini, M. y Carafoli, E. (1984) Different conformational states of purified Ca<sup>2+</sup>-ATPase of the erythrocyte plasma membrane revealed by controlled proteolysis. *J. Biol. Chem.* 259: 8471-8477.
- Benaim, G., Clark, A. y Carafoli, E. (1986) ATPase activity and Ca<sup>2+</sup> transport by reconstituted tryptic fragments of calcium pump of erythrocyte plasma membranes. *Cell calcium* 7: 175-186.
- Benaim, G. y de Meis, L. (1989) Activation of the purified erythrocyte plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase by organic solvents. *FEBS Lett.* 244: 484-486.
- Benaim, G. y de Meis, L. (1990) Similarities between the effects of dimethyl sulfoxide and ethanol on the red cell Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1026: 87-92.
- Benaim, G. y Romero, P.J. (1990) A calcium pump in plasma membrane vesicles from *Leishmania braziliensis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1027: 79-84.
- Benaim, G. (1993) Homeostasis intracelular del calcio. La calmodulina y la Ca<sup>2+</sup>-ATPasa de la membrana plasmática de *Trypanosomatids*. *Acta Cient. Venezol.* 44: 57-66.
- Benaim, G., Lopez-Estrafo, 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.
- Benaim, G., Cervino, V., Lopez-Estrafo, C. y Weitzman, C. (1994) Ethanol stimulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1195: 141-146.
- Benaim, G., Moreno, S. N. J., Hutchinson, G., Cervino, V., Hermoso, T., Romero, E., Ruiz, F., de Souza, W. y Docampo, R. (1995) Characterization of the plasma membrane calcium pump from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. J.* 306: 299-303.
- Benaim, G. (1995) Intracellular Calcium Signaling and Regulation in *Leishmania*. En "Molecular and Immune Mechanisms 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.
- Beridge, M. J. (1984) Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* 220: 345-360.
- 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.
- 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.
- Carafoli, E. (1987) Intracellular Calcium Homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 395-433.
- Carafoli, E. (1991) Calcium Pump of the Plasma Membrane. *Physiol. Rev.* 71:129-153.
- Carafoli, E. y Guerini, D. (1993) Molecular and Cellular Biology of Plasma Membrane Calcium ATPase. *Trends Cardiovasc. Med.* 3: 117-184.
- Carafoli, E. (1994) Biogenesis: Plasma Membrane Calcium ATPase: 15 Years of Work on the Purified Enzyme. *FASEB J.* 8: 993-1002.
- Carafoli, E., García-Martín, E. y Guerini, D. (1996) The Plasma Membrane Calcium Pump: Recent Developments and Future Perspectives. *Experientia* 52: 1091-1100.
- 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.
- Coelho-Sampaio, T., Ferreira, S.T., Benaim, G. y Vieira, A. (1991) Dissociation of purified erythrocyte Ca<sup>2+</sup>-ATPase by hydrostatic pressure. *J. Biol. Chem.* 266: 22266-22272.
- Gandhi, C. R. y Ross, D. H. (1989) Mechanisms of Ethanol on Calcium, Inositol Phospholipids and Intracellular Signaling Mechanisms. *Experientia*. 45: 407-413.
- 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: 2385-2386.
- Suju, M., Dávila, M., Poloé, G., Docampo, R. y Benaim, G. (1996) Phosphatidylethanol stimulates the plasma membrane calcium pump from human erythrocytes. *Biochem. J.* 317: 933-938.