



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

**ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD Y EXPRESIÓN DE LA ATPASA DE  
Ca<sup>2+</sup> DE MEMBRANA PLASMÁTICA (PMCA) EN HEPATOCITOS  
CON CONTENIDOS VARIABLES DE COLESTEROL.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIOLOGO**

**P R E S E N T A:**

**ARMANDO CRUZ RANGEL**

DIRECTOR: M. en C. BLANCA ALICIA DELGADO COELLO

CO-DIRECTOR: DR. JAIME MAS OLIVA



LOS REYES IZTACALA

2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*Esta tesis se la dedico a Dios y a la naturaleza, por permitirme conocer un poco de su  
esencia.....*

*A mis estrellas guardianes que me protegen desde el cielo (Rosendo, Héctor y Carlota)*

*A mis padres por darme cada quien la mitad de su vida*

*A mi hermanito Isaac (Casper) que me enseña día con día lecciones de la vida.*

*A mi abuelita por su apoyo y confianza.*

*A mi Universidad, la U.N.A.M máxima casa de estudios "Gloria para ti".*

## **AGRADECIMIENTOS.**

Deseo expresar mi mas sincero agradecimiento al Dr. Jaime Mas-Oliva y a la M. en C. Blanca Alicia Delgado Coello, quienes mas que asesores, son mis amigos incondicionales. Ellos no solo me dieron la oportunidad de realizar esta tesis de investigación, sino también me brindaron su confianza, apoyo, tiempo y paciencia.

A los miembros del comité de sinodales: Dr. Sergio González Moreno, "*culpable de mi gusto por la bioquímica*", Dr. Roberto Velasco García, Dr. Martín Palomar Morales y Dr. Eduardo Barrera Escorcía. Por sus valiosísimas críticas y sugerencias que contribuyeron a la culminación de esta obra.

A mis maestros de toda la carrera a quienes solo me resta decirles..... **¡Gracias!**

A la Bióloga Marcela Sosa Garrocho técnica académica de la Dra. Marina Macías, por su colaboración y apoyo técnico en la elaboración de este proyecto.

A la Bióloga Beatriz Hernández Téllez del laboratorio del Dr. Andrés Castell de la Facultad de Medicina por su valiosa aportación técnica a este trabajo.

A la Bióloga Teresa Montiel Montes técnica académica del laboratorio de la Dra. Lourdes Massieu por facilitarnos el equipo para cuantificar colesterol.

Al MVZ Héctor Malagón Rivero del bioterio del Instituto de Fisiología Celular, por el manejo escrupuloso de los animales.

A mis amigos y compañeros del laboratorio (Pao, Danaí, Fátima, Quique, Vic, Chava, Luis Pablo, Sra. Lupita, Malena y en especial a Sandrita, quien se fumaba unos cigarrillos conmigo en momentos difíciles durante mi estancia en este laboratorio.

A mis amigos y compañeros de la carrera. Gracias por las incontables experiencias durante el transcurso de la carrera.

No menos importantes mis amigos de la prepa; es un gusto saber que existen.

## INDICE TEMATICO.

### ABREVIATURAS

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>2</b>
1.1 Dominios de membrana ricos en colesterol	3
1.2 Características generales de la ATPasa de $\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática	7
1.3 Topología de la bomba de $\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática	9
1.4 Ciclo catalítico de la ATPasa de $\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática	13
1.5 Planteamiento del problema	15
<b>II. HIPÓTESIS</b>	<b>19</b>
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
<b>IV. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>20</b>
4.1 Aislamiento y cultivo de Hepatocitos	20
4.2 Aislamiento de las membranas plasmáticas de hepatocitos	21
4.3 Caracterización de la fracción obtenidas de membranas plasmáticas de hepatocitos	22
4.4 Depleción del colesterol de la fracción de membranas plasmáticas	23

<b>4.5</b>	Cuantificación de colesterol en la fracción membranal de hepatocitos	<b>24</b>
<b>4.6</b>	Aislamiento de balsas lipídicas	<b>25</b>
<b>V.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>26</b>
<b>5.1</b>	Caracterización de la preparación de membranas	<b>26</b>
<b>5.2</b>	Efecto de M $\beta$ CD sobre la actividad enzimática de la ATPasa de Ca <sup>2+</sup> de la membrana plasmática de hepatocitos de hígado de rata	<b>31</b>
<b>5.3</b>	Asociación de PMCA a membranas resistentes a detergentes (DMRs)	<b>35</b>
<b>VI.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>37</b>
<b>VII.</b>	<b>CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS</b>	<b>43</b>
<b>VIII.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>45</b>
<b>IX.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>46</b>

## ABREVIATURAS.

<b>ATP</b>	Adenosintrifosfato.
<b>ADP</b>	Adenosindifosfato.
<b>BSA</b>	Albúmina de Suero Bovino.
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Carbono.
<b>CaM</b>	Calmodulina.
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DMEM</b>	Medio Dulbecco`s Modificado por Eagle`s
<b>EDTA</b>	Etilen diamino tetra acetato (ácido)
<b>EGTA</b>	Etilen glicol tetraácido acetato (ácido)
<b>GPI</b>	Glucosilfosfatidilinositol.
<b>HEPES</b>	N-2-hidroxietilpiperazina del ácido N'-2-etansulfónico.

<b>IF</b>	Intermediario Fosforilado.
<b>IHQ</b>	Inmuno Histoquímica
<b>ITS</b>	Insulina-Transferrina-Selenita.
<b>KD</b>	Kilodaltones.
<b>Km.</b>	Constante de Michaelis-Menten.
<b>KR</b>	Krebs Ringer.
<b>MβCD</b>	Metil-β-ciclodextrina
<b>mg/ml</b>	miligramos / mililitro.
<b>ML</b>	Microdominios Lipídicos.
<b>MOPS</b>	Acido 3-(N-morfolino)propanosulfónico.
<b>PBS</b>	Buffer salino de fosfatos.
<b>Pi</b>	Fosfato inorgánico.
<b>PKA</b>	Proteína cinasa A.

<b>PKC</b>	Proteína cinasa C.
<b>PMCA</b>	ATPasa de $\text{Ca}^{2+}$ de la Membrana Plasmática.
<b>PMSF</b>	Fenilmetanosulfonil Fluoruro.
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto.
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sodio.
<b>SERCA</b>	ATPasa de $\text{Ca}^{2+}$ de la Membrana de Retículo Sarcoplasmático.
<b>TCA</b>	Acido tricloro acético.
<b>Tris-HCl.</b>	2-Amino-2-(hydroxymetil)-1,3-propanediol, hydrocloruro

## **RESUMEN.**

La ATPasa de calcio de la membrana plasmática (PMCA) es una enzima de gran importancia en la célula eucarionte que utiliza la hidrólisis de ATP para expulsar el  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma hacia el espacio extracelular, regulando de manera fina las concentraciones intracelulares del catión. La cinética de la enzima es distinta en el hepatocito dado que no es regulada por calmodulina y no es inhibida por vanadato. Además, diversas hormonas y el ambiente lipídico que la rodea tienen gran importancia en su regulación. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado de manera específica que el colesterol regula la actividad enzimática de PMCA en diferentes tejidos. Asimismo, hemos demostrado previamente que el colesterol confiere termoestabilidad a la enzima. En este trabajo se explora por primera vez, el papel que desempeña el colesterol de la membrana plasmática del hepatocito, como regulador de la actividad enzimática de la PMCA. Destaca el hecho de que la actividad de la enzima se ve disminuida de manera importante cuando las preparaciones de membranas se depletan parcialmente de colesterol en presencia de metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) a distintas temperaturas de preincubación. Este resultado contrasta con trabajos previos en preparaciones de membranas de sarcolema y de eritrocito en donde la actividad de PMCA aumenta cuando se retira colesterol de las membranas. Con base en lo reportado en la literatura, es factible que la asociación de PMCA a dominios tipo balsa lipídica permita explicar lo observado.

## **I. INTRODUCCIÓN.**

La membrana plasmática es un complejo sistema dinámico compuesto por una gran diversidad de lípidos y proteínas integrales. Dicho sistema desempeña las funciones de contener, delimitar y proteger el contenido intracelular con el medio externo, además de tener la característica de ser permeable selectivamente.

Todas las membranas de las células eucariontes poseen una matriz de lípidos básica común, compuesta de fosfolípidos, glicolípidos y esteroides; en animales el esteroide predominante es el colesterol (Fig. 1).

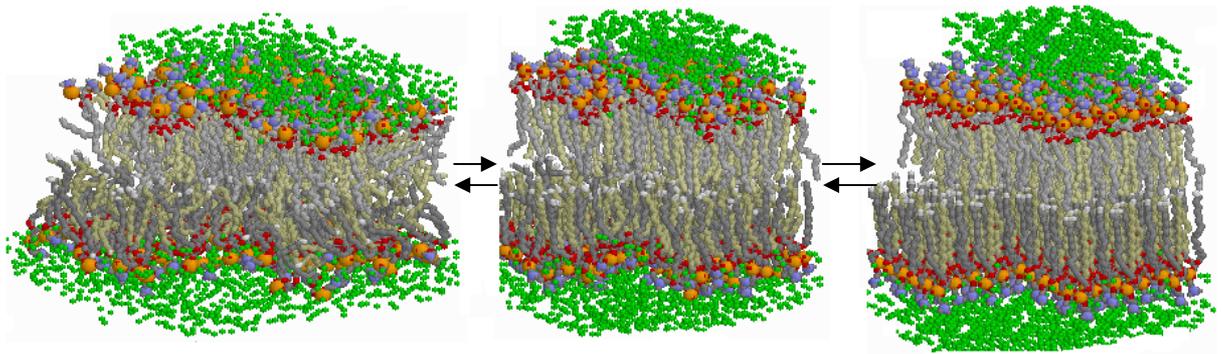
Se conoce ampliamente el papel que desempeña el colesterol sobre la permeabilidad de la bicapa lipídica, ya que refuerza su carácter como barrera permeable. Las moléculas de colesterol se orientan con sus grupos OH hacia las cabezas polares de los fosfolípidos, mientras que sus anillos esteroideos, planos y rígidos inmovilizan las regiones de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos más cercanas a las cabezas polares, dejando el resto de la cadena más flexible (Fig. 1B). Al disminuir la movilidad de los primeros -CH<sub>2</sub>- de las cadenas hidrocarbonadas, el colesterol permite a la bicapa lipídica ser más rígida en esa región, evitando de esa manera el libre flujo de moléculas pequeñas solubles como iones, glucosa o agua (Gier y col. 1969., Finkelstein, 1976). Asimismo, el colesterol actúa como modulador del grosor de la membrana plasmática, ya que al encontrarse intercalado con las cadenas acilo de los fosfolípidos tiende a disminuir su flexibilidad y movilidad; de esa manera las cadenas incrementan su longitud y por lo tanto el grosor de la bicapa (Aloia y Boggs 1985; Mitra y col. 2003). Una importante característica que confiere el colesterol a la membrana plasmática es la capacidad de modular su fluidez, debido a que el colesterol impide que las cadenas acilo de los fosfolípidos se unan y cristalicen. Cuando la membrana plasmática se encuentra en estado físico líquido-cristalino, el colesterol disminuye la movilidad de las cadenas acilo de

los fosfolípidos; en contraste, cuando la membrana se arregla en estado cristalino-rígido (gel), el colesterol incrementa la movilidad de las cadenas acilo de los fosfolípidos. De esta manera, el colesterol permite que la membrana plasmática se mantenga a temperaturas fisiológicas dentro de una fase líquida ordenada (Aloia y Boggs 1985; Ortega y Mas-Oliva 1984).

### **1.1 Dominios de membrana ricos en colesterol**

En los últimos años el colesterol ha cobrado relevancia como componente esencial en la formación de microdominios lipídicos (ML) en la membrana plasmática. Tales dominios son conocidos comúnmente como balsas lipídicas (*lipid rafts*). Los ML son estructuras que fueron caracterizadas como segmentos membranales resistentes a la solubilización por detergentes no iónicos como el Tritón X-100, debido a que se encuentran altamente enriquecidos en colesterol y esfingolípidos (Brown, 1998; Munro, 2003). Se ha postulado que estos dominios poseen las siguientes características: tendencia a formar una fase de estado físico líquido-ordenado en mayor grado que el resto de la membrana, tener baja densidad y presentar un grado elevado de asociación entre sus lípidos. Estas características les confieren a los ML la capacidad de “flotar” sobre la membrana, formando una especie de plataforma. Además, se tiene evidencia de proteínas asociadas a estas estructuras tales como: proteínas ancladas por GPI (*glucosilfosfatidilinositol*), GTPasas, cinasas y receptores a diferentes ligandos como hormonas y neurotransmisores, los cuales están involucrados en la activación de diversas cascadas de señalización celular como: las vías de recambio de fosfoinosítidos-calcio, ERK-MAP cinasas entre otras. (Munro, 2003., Edidin, 2003).

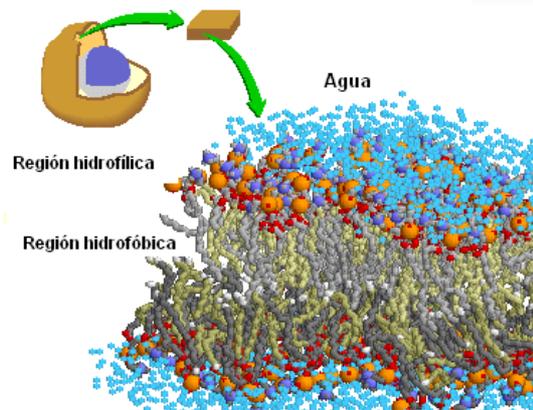
A)



Fluida

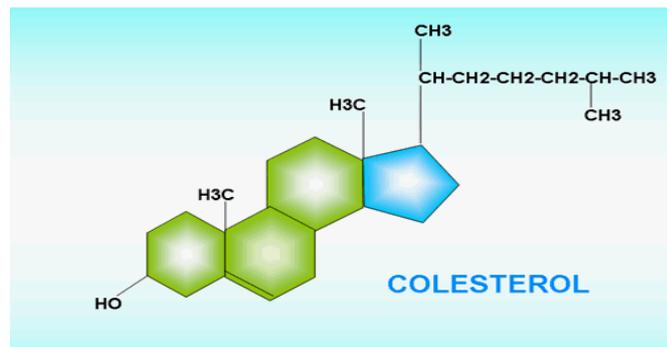
Gel

Cristal



Membrana plasmática

B)



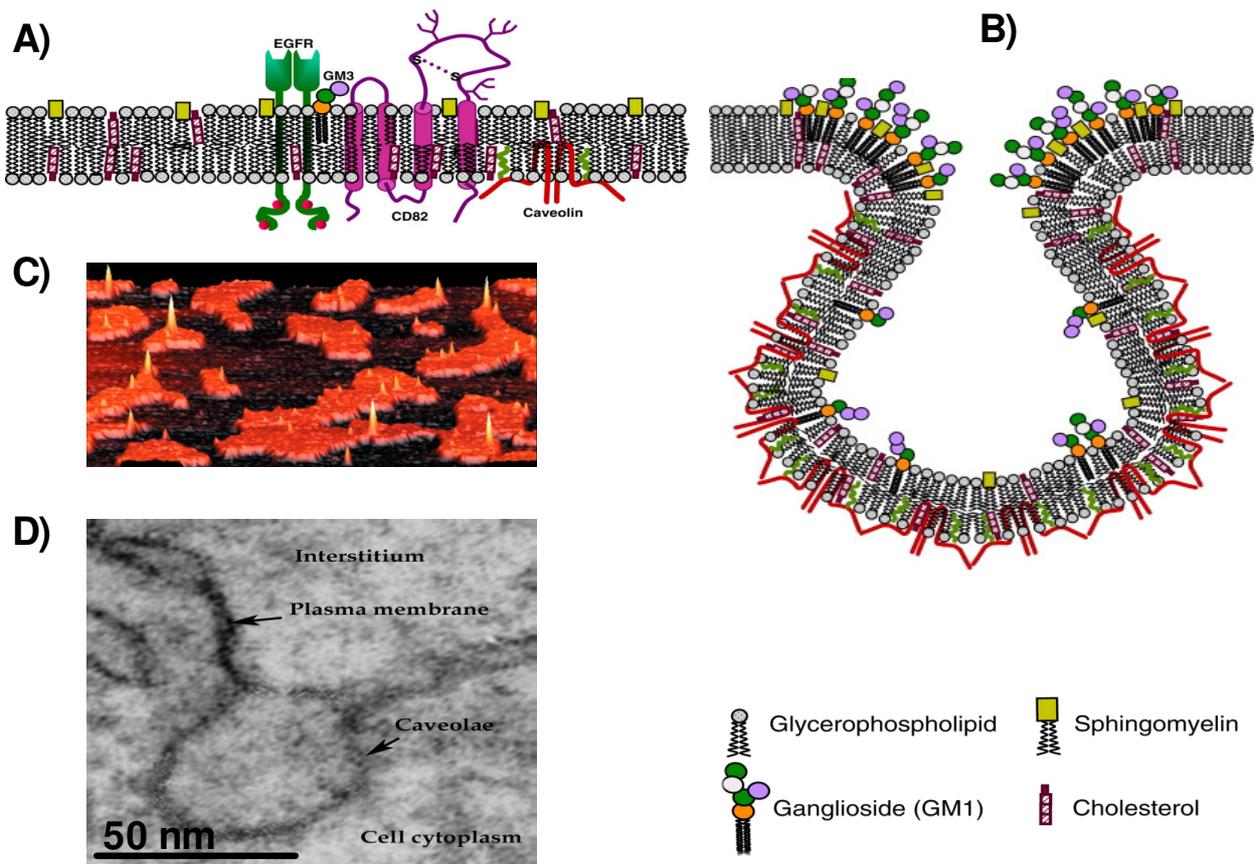
**Figura 1.** A) Simulación de dinámica molecular de una bicapa de fosfatidil colina en diferentes fases, y una membrana plasmática. En verde las moléculas de agua, naranja, rojo y azul los miembros que integran la cabeza polar del fosfolípido; finalmente en gris los grupos acilo (tomado de Heller y col. 1993). B) Representación esquemática de la estructura química del colesterol.

Por lo anterior, diversos autores han propuesto que la existencia de los ML incrementa la eficiencia de la transducción de señales, al facilitar las interacciones entre agonistas y receptores. En disciplinas como la inmunología, se ha sugerido que las balsas lipídicas funcionan como plataformas de reconocimiento molecular y de entrada entre patógenos y células huésped (Munro, 2003, Van der Groot y Harder, 2001).

Existen otros tipos de dominios lipídicos denominados caveolas (Fielding y Fielding 2000; Isshiki y Anderson, 2003). Éstas, al igual que las balsas lipídicas, son dominios ricos en esfingolípidos y colesterol; sin embargo, la diferencia entre balsas y caveolas radica en que las caveolas forman invaginaciones en la membrana, debido a que contienen proteínas denominadas caveolinas que permiten a dichos dominios adoptar una forma cóncava (Fig. 2).

Asociados a las caveolas, se ha determinado la existencia en mayor proporción de proteínas encargadas de regular la homeostasis del calcio intracelular, como lo son el intercambiador de  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  y la ATPasa de calcio de la membrana plasmática (PMCA), objeto de este trabajo. (Fielding y Fielding 2000; Isshiki y Anderson, 2003). De manera concreta se ha demostrado en membranas de células pulmonares (Fujimoto, 1993) células mesoteliales peritoneales, músculo cardíaco, músculo liso y endoteliales basolaterales (Schnitzer y col, 1995) que la PMCA se encuentra hasta 25 veces más concentrada en las caveolas que en el resto de la membrana plasmática, lo cual sugiere la importancia de estos dominios en la regulación de las funciones celulares dependientes de calcio. (Fujimoto, 1993; Schnitzer y col, 1995).

De gran interés para nuestro grupo, ha sido explorar la capacidad del colesterol membranar como regulador de la actividad enzimática de PMCA. Trabajo realizado en nuestro laboratorio así como por otros autores, propone que el colesterol regula los



**Figura 2.** Esquemas representativos de los microdominios lipídicos. A) Balsa lipídica. B) Caveola (tomadas de Sonnino y Prinetti, 2009). C) Imagen tridimensional de balsas lipídicas modelo tomada con microscopio de fuerza atómica. La preparación se realizó con una mezcla binaria de lípidos 1,2-dioleil-sn-glicerol (negro) y esfingomiélna (naranja) obteniendo dominios tipo balsa lipídica que se separan del resto de la membrana. Los picos sobresalientes representan proteínas unidas por GPI las cuales se posicionan preferentemente sobre los microdominios (tomada de Tresset, 2009). D) Electronmicrografía de corte transversal de fibroblastos, en la cual se puede observar una caveola (tomada de Anderson, 1993).

cambios conformacionales de las enzimas membranales para realizar su función (Yeagle y col. 1988; Ortega y col. 1984).

Previamente hemos demostrado el efecto del colesterol sobre la ATPasa de calcio de la membrana plasmática de sarcolema cardiaco, mostrando que altos niveles de colesterol correlacionan con una baja actividad de ATPasa, y viceversa, bajas concentraciones de colesterol determinan un aumento en la capacidad hidrolítica de la bomba de calcio (Ortega y Mas-Oliva, 1984). El mismo efecto fue reportado por el grupo de Yeagle para la ATPasa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  de fantasmas de eritrocito humano y de células de riñón, mostrando que la incorporación de altas concentraciones de colesterol promueva que la actividad basal de la ATPasa disminuya alrededor de 50%, en comparación con la actividad de membranas nativas (Yeagle, 1983., Yeagle y col. 1988).

Asimismo, demostramos en preparaciones de membranas microsomales de músculo cardiaco de bovino enriquecidas con colesterol, que la PMCA adquiere termoestabilidad a rangos de temperatura superiores a la fisiológica (42°- 60°) en comparación con membranas nativas en donde se observa un abatimiento de la actividad de hidrólisis a este rango de temperatura. Posiblemente el colesterol a altas temperaturas actúa cooperativamente con el sistema para conferir a la enzima una conformación estructural estable frente al cambio físico ejercido sobre la fluidez de la membrana (Ortega y col., 1996; Santiago-García, y col. 2000; Mas-Oliva y Delgado-Coello, 2007).

## **1.2 Características generales de la ATPasa de $\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática**

La ATPasa de calcio de la membrana plasmática es una enzima que mediante la hidrólisis de ATP expulsa  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma hacia el espacio extracelular, regulando de manera fina las concentraciones intracelulares del catión. Fue descrita por primera vez en fantasmas de eritrocito humano por Schatzmann en 1966, y presenta una amplia

distribución en células eucariontes (Fujimoto 1993; Wang y col., 2004; Domi y col., 2007). La PMCA representa cerca del 0.01-0.1% del total de proteína membranal (Knauf y col., 1974; Carafoli, 1992), sin embargo es uno de los principales sistemas de expulsión y regulación de los niveles de calcio citoplásmico.

La familia de las bombas de calcio consta de cerca de 30 proteínas distintas (Keeton y Shull, 1993). En el humano se conocen hasta 30 isoformas producto de 4 genes y 2 sitios principales de edición alternativa (sitios A y C). La mayoría de ellas se expresa en diferentes estadios de desarrollo, y su expresión varía entre tejidos (Hammes y col., 1994; Delgado-Coello y col., 2003; Sepúlveda y col., 2006; Domi y col., 2007).

La bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática ha sido catalogada dentro de las ATPasas tipo "P" por formar durante su ciclo catalítico un intermediario fosforilado (IF), lo cual es característica canónica de este tipo de bomba (Pedersen y Carafoli 1987). Otras características consideradas en general para las PMCA son:

- Requieren de  $\text{Mg}^{2+}$  como cofactor.
- Se inhiben en presencia de vanadato y lantano.
- Poseen una masa molecular que oscila entre 134 y 140 KD.
- Su estequiometría entre  $\text{Ca}^{2+}$  /ATP es 1:1.
- En su mayoría son reguladas por calmodulina (CaM).

La PMCA es uno de los sistemas con mayor afinidad por el calcio, presenta una  $K_m$  basal alrededor de 20  $\mu\text{M}$ , la cual en presencia de CaM aumenta hasta 0.5  $\mu\text{M}$  (Niggli y col. 1981). A pesar de exhibir alta afinidad por el catión, su capacidad de transporte es baja, ya que transporta aproximadamente 0.5 nmoles/mg de proteína/seg, en comparación con la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de retículo sarco endoplásmico (SERCA) que exhibe una  $K_m$  menor a 0.5  $\mu\text{M}$  y su capacidad de transporte es cercana a los 70 nmoles/mg de proteína/seg (MacLennan 1970), así como del intercambiador  $\text{Na-Ca}^{2+}$ , que

muestra una afinidad por calcio de 0.3  $\mu\text{M}$ . En función del transporte de calcio, la PMCA muestra dos sitios de afinidad por ATP; un sitio de alta afinidad, que se considera el sitio catalítico de la enzima y presenta una  $K_m$  cercana a 1-2.5  $\mu\text{M}$  mientras que el sitio de baja afinidad muestra una  $K_m$  alrededor de 145-148 $\mu\text{M}$  (Carafoli 1992; Carafoli y Guerini, 1997).

En ausencia de CaM, la ATPasa es activada por mecanismos alternos que tienen efecto directo sobre su  $K_m$ , tales como: la exposición de la enzima a fosfolípidos ácidos o ácidos grasos poliinsaturados (Niggli y col., 1981; Luciana y col., 2007), tratamientos proteolíticos (Taverna, 1980), fosforilación en el sitio C por PKA o PKC, (Caroni y Carafoli, 1981; Smallwood y col., 1988) y por la inducción de un estado oligomérico (Kosk-Kosicka y Bzdega, 1988).

### **1.3 Topología de la bomba de $\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática**

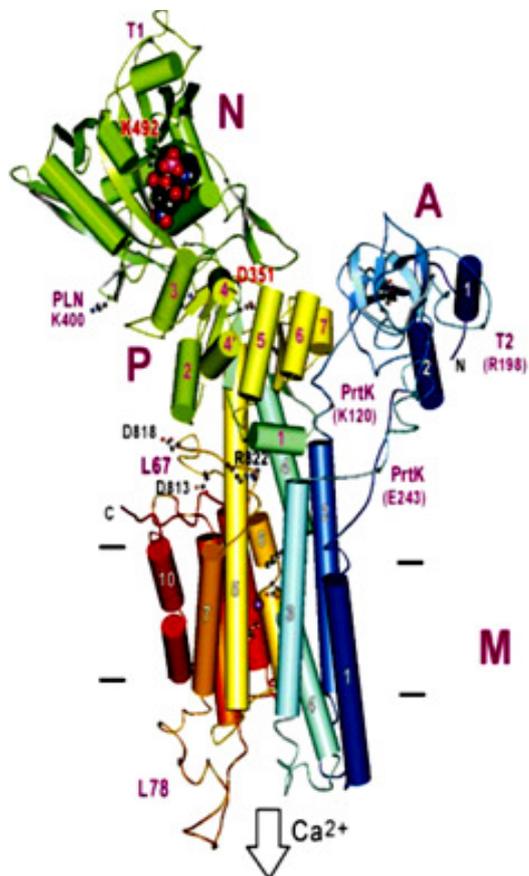
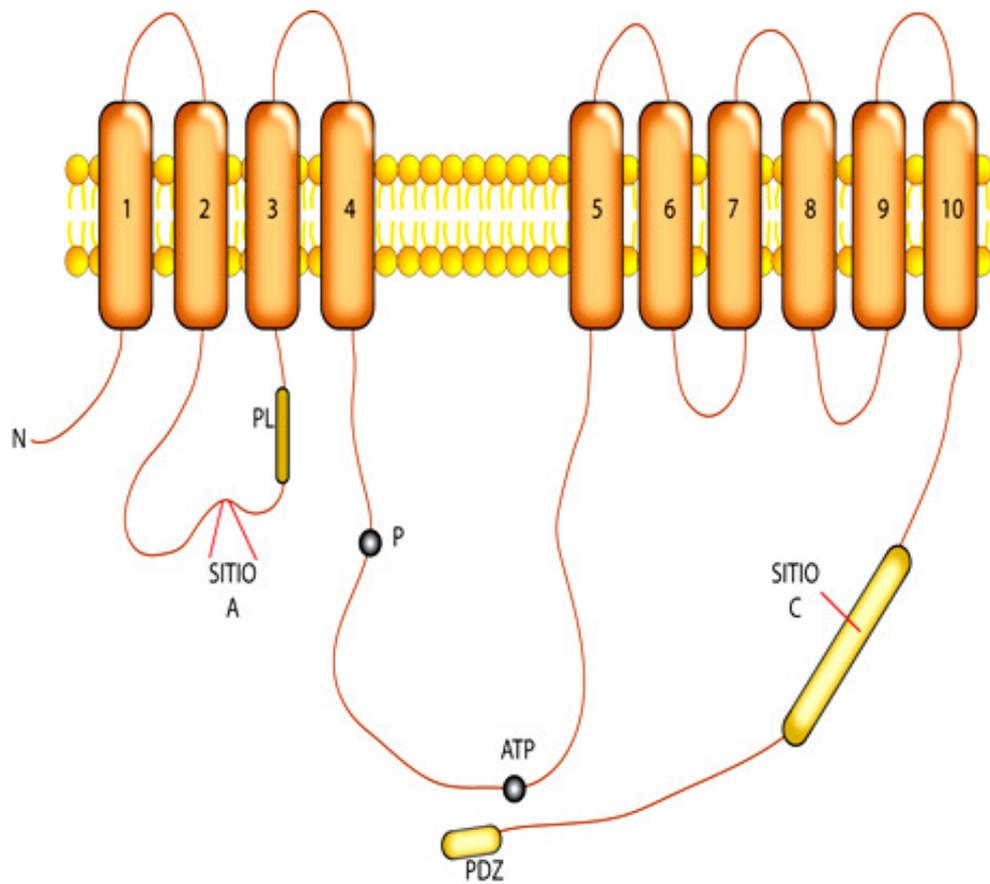
Se ha sugerido con base al alineamiento múltiple entre las secuencias de aminoácidos de SERCA y PMCA, y de los datos obtenidos del cristal de SERCA (Toyoshima y col., 2000), programas computacionales de predicción de estructura secundaria, perfiles de hidrofobicidad y de estructura terciaria, que la PMCA posee 10 cruces transmembranales que interconectan 4 unidades citoplásmicas. Dichas unidades representan aproximadamente el 80% de la masa total de la proteína (Carafoli 1992; MacLennan, 1970) (Fig.3).

La primera unidad citoplásmica corresponde al extremo amino terminal y está constituida por 90-100 residuos de aminoácidos, dependiendo de la isoforma que se trate. La segunda unidad incluye al sitio A adyacente al sitio de unión con fosfolípidos. El tercer dominio contiene el sitio catalítico o el sitio de fosforilación correspondiente al Asp 475 en el que se forma la unión covalente con el fosfato  $\gamma$  del ATP; además contiene el residuo conservado de (Lys 609) el cual se encarga de fijar el ATP. La cuarta unidad corresponde

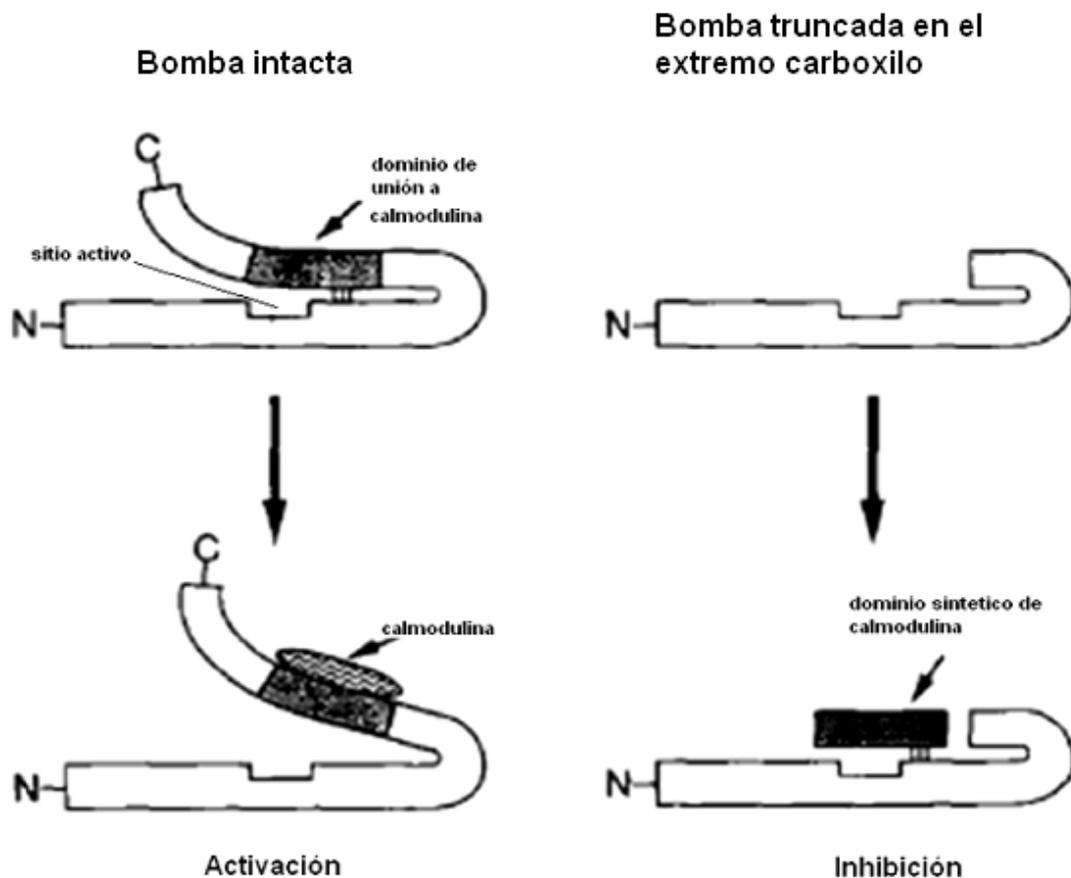
al carboxilo terminal de la proteína, donde se localiza el sitio de unión a CaM (sitio C) (Fig 3).

El análisis del segmento de unión a CaM, se realizó por digestión parcial de la ATPasa con tripsina, (James y col. 1988; Zurini y col 1984; Benaim y col. 1984) donde se observó la formación de fragmentos con peso molecular de 90, 85, 81 y 76 KD. Los fragmentos correspondientes a 90 KD presentaron baja actividad basal, sin embargo en presencia de CaM y fosfolípidos los fragmentos muestran actividad hidrolítica de ATP. Los fragmentos de 85 y 81 KD exhibieron pérdida de sensibilidad a CaM pero conservaron su afinidad por los fosfolípidos. Finalmente los fragmentos de 76 KD perdieron su afinidad por CaM y fosfolípidos.

La remoción del sitio de unión a CaM, durante la formación de dichos fragmentos, conducen consecuentemente a la recuperación parcial de la actividad basal de la bomba, sugiriendo que dicho segmento actúa como un dominio autoinhibitorio, es decir, que posiblemente dicho fragmento se une a diferentes sitios de regulación de la bomba como son el sitio catalítico y el de interacción con fosfolípidos.



**Figura 3.** Topología de la bomba de calcio de la membrana plasmática. El modelo se propuso inicialmente con base a la secuencia de SERCA, la proteína presenta 10 cruces transmembranales (**M**) conectados por dominios citoplásmicos. La primera unidad es el extremo amino (**N**), la segunda asa citoplásmica contiene el sitio A vecino al sitio de unión a FL y un sitio de interacción con el dominio autoinhibitorio de calmodulina (CaM) (**A**). La tercera asa citoplásmica contiene el sitio catalítico donde se une ATP, así como el sitio de fosforilación (**P**). Finalmente la unidad que protruye del cruce transmembranal 10, representa el extremo carboxilo terminal, el cual contiene el sitio de unión con CaM y en algunas isoformas un dominio PDZ que reconoce residuos hidrofóbicos ubicados en el extremo carboxilo terminal de pequeños péptidos. En la parte inferior se muestra la imagen del cristal de SERCA reportado por Toyoshima y col. 2000, el cual confirma el modelo propuesto inicialmente para PMCA.



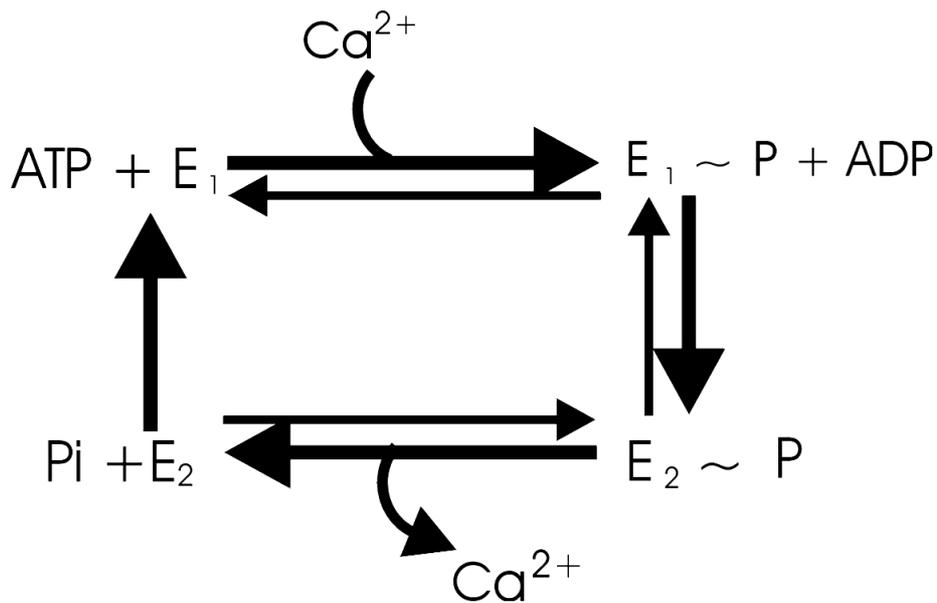
**Figura 4.** Esquema que visualiza el rol del dominio de unión a CaM durante la inhibición catalítica de la bomba de calcio. (Falchetto y col. 1991).

La idea de que el sitio de unión a CaM interacciona con otros segmentos de la ATPasa para inhibir su actividad catalítica, fue demostrada a través de la exposición de la enzima truncada en el extremo carboxilo (por la proteasa calpaina) a un análogo sintético fotoactivable de dicho sitio.

Los resultados demostraron que este fragmento interacciona con el sitio catalítico de la bomba y con el dominio regulado por fosfolípidos (Falchetto y col., 1991). Hipotéticamente, en ausencia de CaM el extremo carboxilo interacciona con sus sitios receptores, evitando la activación continua de la bomba (Fig. 4). En conclusión, cuando CaM interactúa con su dominio de unión, se desprende el fragmento de sus sitios receptores y se favorece la formación de la fosfoenzima. Además de su participación como regulador de la actividad catalítica, el segmento carboxilo posee sitios de reconocimiento a las proteínas cinasas PKA y PKC (Wang, y col. 1991) que participan en la activación de diversas cascadas de señalización celular.

#### **1.4 Ciclo catalítico de la ATPasa de $\text{Ca}^{2+}$ de la membrana plasmática**

Debido a que PMCA posee la capacidad de formar intermediarios fosforilados (IF) en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y ATP, se le ha clasificado dentro de las ATPasas tipo P (Pedersen y Carafoli, 1987). En la figura 5 se muestra el esquema resumido del ciclo catalítico propuesto para esta enzima.



**Figura 5** Diagrama simplificado del ciclo catalítico de la ATPasa de Calcio de la membrana plasmática.

Básicamente el esquema representa dos estados conformacionales llamados E1 y E2. Aparentemente estas dos conformaciones poseen diferente afinidad por calcio, así como una orientación diferente en el plano de la membrana. La conformación de alta afinidad (E1) se orienta hacia el citoplasma mientras que la conformación de baja afinidad por Ca<sup>2+</sup> (E2) se orienta hacia el exterior cuando la enzima realiza su trabajo de expulsión de calcio (Mas-Oliva y Varela, 1987).

La hidrólisis del ATP es favorecida a concentraciones micromolares de Mg<sup>2+</sup>, el cual acelera la hidrólisis del enlace  $\gamma$  del ATP favoreciendo un estado conformacional transitorio E1-Ca<sup>2+</sup>-P de alta reactividad a un estado transitorio de baja reactividad E2-Ca<sup>2+</sup>-P. Una vez que el Ca<sup>2+</sup> es liberado, se forma E2-P. Algunos autores proponen que esta conformación expone el enlace acilo-fosfato a un ambiente hidrofílico que lo hace susceptible a ser hidrolizado, liberando de esa manera el Pi y formando E2 + Pi. Una vez que el Pi es liberado, la enzima regresa al estado inicial E1 (Rega y Garrhan, 1975; Allen y col., 1987). Nuestro grupo de trabajo demostró que CaM acelera la

desfosforilación del intermediario fosforilado, de manera que CaM estimula tanto el transporte de calcio como la velocidad del ciclo catalítico de la enzima (Mas-Oliva, 1992; Delgado-Coello y col.1996).

Con respecto al ciclo reverso ( $E2 \rightarrow E1$ ) que implica la formación de ATP a partir de ADP y Pi, nuestro grupo de trabajo evidenció en membranas de eritrocitos, que al incrementar la hidrofobicidad del medio y las concentraciones de  $Ca^{2+}$  en el mismo, la actividad hidrolítica de ATP disminuye y se observa un aumento en la síntesis de dicho nucleótido (Mas-Oliva, 1985; Mas-Oliva, 1992), lo que concuerda con los datos previamente establecidos para la ATPasa de retículo endoplásmico (De Meis y col., 1981).

Resulta sorprendente que exista un mecanismo de generación de un compuesto de alta energía como es el ATP a partir de compuestos fosfatados de baja energía como son el ADP y el Pi, sin el requerimiento de gasto energético. Una propuesta para explicar el ciclo reverso es mediante la energía de desolvatación, lo que implica la importancia del ambiente hidrofóbico alrededor del sitio activo de la ATPasa. El aumento en la concentración de calcio favorece que las moléculas de agua que se encuentran rodeando tanto al sitio catalítico como al ADP y Pi se unan al catión; de esta manera el sitio activo y los compuestos fosfatados resultan deshidratados, permitiéndole a la enzima llevar a cabo la síntesis de ATP a partir del ADP y al Pi (De Meis y Alves, 2004). Esta conservación energética mostrada por PMCA en el ciclo reverso, fue demostrada en nuestro laboratorio en células derivadas de hepatoma AS-30D (Mas-Oliva y col. 1991).

### **1.5 Planteamiento del problema.**

El hepatocito es una célula altamente polarizada con una membrana plasmática dividida en tres grandes dominios: el dominio sinusoidal, que mantiene contacto con el aporte sanguíneo proveniente de la vena porta, en donde se encuentran receptores de

hormonas, factores de crecimiento y metabolitos; el dominio canalicular responsable de la secreción biliar, y finalmente el dominio basolateral el cual contiene diferentes complejos de comunicación con hepatocitos adyacentes (desmosomas y uniones gap y canaliculares) (Calvo y col. 2001). En el hígado la PMCA exhibe diferencias bioquímicas importantes respecto a ATPasas de otros tejidos; en la tabla I se muestran las diferencias existentes entre la PMCA de hígado y la PMCA del eritrocito. Cabe mencionar que ahora se sabe que las isoformas más abundantes en hígado son la 1, seguida de la isoforma 4 (Stauffer y col. 1993; Howard y col. 1994; Delgado-Coello y col., 2003), en contraste con el eritrocito, donde la más abundante es la isoforma 4 (James y col., 1988).

**Tabla I. Diferencias específicas entre la bomba de  $Ca^{2+}$  de la membrana plasmática de hepatocito y eritrocito (modificado desde Schatzmann 1966 y Kasler 1990).**

<b>Característica</b>	<b>PMCA Hígado</b>	<b>PMCA Eritrocito</b>
Peso molecular.	110-200 KD.	134-140 KD.
Regulación por CaM.	No	Si
Afinidad por ATP (Km).	Sitio alta afinidad 81 $\mu$ M Sito de baja afinidad 10 mM	Sitio alta afinidad 1-2.5 $\mu$ M Sito de baja afinidad 148 $\mu$ M
Afinidad por $Ca^{2+}$ (Km).	1.6 - 0.017 $\mu$ M.	0.5 – 20 $\mu$ M.

En el caso específico del hígado, se ha descrito que la PMCA no es regulada por CaM; por lo que se ha dificultado su purificación por métodos convencionales. Sin embargo, cabe mencionar que aunque aparentemente la enzima no responde a CaM, Kessler en 1990 demostró bajo condiciones desnaturalizantes que la PMCA une CaM en concentraciones de entre 1 y 3 nM, es decir, con mayor afinidad que la ATPasa de eritrocitos cuya Kd es de 4 nM (Graf y Penniston, 1981). Por ello, se sugiere que posiblemente el sitio de unión a CaM se encuentre enmascarado (Kessler y col. 1990).

La regulación de las ATPasas hepáticas es aún más compleja debido a que intervienen hormonas como vasopresina, epinefrina, calcitonina, glucagón y por un péptido derivado de la hidrólisis de glucagón por acción endopeptidasas hepáticas, denominado miniglucagón (Lotersztajn y col., 1981; Lin y col. 1983; Prpic y col., 1984; Lotersztajn y col., 1987; Lotersztajn y col., 1990; McKenzie y col., 1990; Jouneaux y col., 1993).

Desde hace tiempo en nuestro laboratorio comenzó a estudiarse el comportamiento cinético de la ATPasa de calcio del hígado de rata, utilizando células derivadas del hepatoma AS-30D y de hígado en regeneración, usados como modelos de crecimiento acelerado pero controlado. En ambas condiciones se demostró que la PMCA posee actividad enzimática sustancialmente menor con respecto a células normales, sugiriendo en ambos casos que la variación cinética pudiera explicarse por posible expresión diferencial de isoformas o incluso por la presencia de isoformas nuevas de PMCA (Mas-Oliva y col., 1991). Siguiendo la línea de investigación Delgado-Coello y col, estudiaron la expresión de transcritos de PMCA 1 y 4 (consideradas constitutivas en diversos tejidos) en células AS-30D y en regeneración, demostrando que PMCA 1 presenta un mayor nivel de expresión en todas las condiciones estudiadas, mientras que la PMCA 4 mantiene una menor expresión en general, pero aun mas baja en hígados en regeneración. A nivel de proteína destaca que se encontró mayor cantidad de ATPasa/mg en hígados en regeneración respecto con hígados normales (Delgado-Coello y col. 2003).

Por otro lado, en referencia al papel del colesterol en la regulación de la enzima, hemos demostrado en membranas plasmáticas de músculo cardiaco de conejo, que la depleción de colesterol afecta la  $V_{max}$  de la enzima, provocando incremento de la tasa catalítica de la ATPasa, lo que sugiere que el colesterol pudiera interactuar directamente con alguna región transmembranal de la enzima para regularla (Mas-Oliva y Santiago-

García, 1990). Estas observaciones concuerdan con lo establecido por Pang y col. quienes reportaron disminución de la actividad catalítica de la bomba en membranas de cerebro porcino enriquecidas con colesterol (Pang y col. 2005). No obstante dichas observaciones contrastan con lo reportado por Jiang y col. quienes determinaron una disminución en la actividad de la bomba cuando se depleta el colesterol de cultivos primarios de neuronas derivadas de hipocampo de embriones de rata (Jiang y col. 2007). En este contexto, es factible decir que en diferentes tejidos, la PMCA responde de manera diferente frente a los cambios de colesterol en la membrana plasmática. En el caso específico del hígado, no se conoce la posible dependencia de PMCA y dominios enriquecidos en colesterol. Dado que el colesterol es parte esencial de los dominios lipídicos, a los que se considera como plataformas de activación e inactivación de cascadas de señalización celular que determinan la funcionalidad de la célula, en específico ante cambios en su entorno, es posible que la asociación entre PMCA y dominios ricos en colesterol sea clave en la regulación del calcio intracelular que dicta las características morfofisiológicas de un tejido específico.

Considerando las características bioquímicas que exhibe la PMCA en el hígado, y que más del 30% de los lípidos de la membrana plasmática del hepatocito se encuentra constituida por colesterol, el objetivo de este trabajo fue estudiar el papel que ejerce dicho lípido sobre la actividad de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática de hepatocitos. Asimismo, determinar la posible asociación de la enzima con dominios ricos en colesterol.

## **II. HIPÓTESIS**

Con base en el conocimiento de la coexistencia de la PMCA con dominios con alto contenido de colesterol en diferentes tejidos, es probable que la depleción parcial de colesterol en la membrana plasmática del hepatocito permita definir cambios en la actividad de la ATPasa, lo que a su vez indique un punto importante en su regulación.

## **III. OBJETIVOS.**

### **➤ Objetivo general.**

Determinar el efecto que ejerce un cambio controlado de concentración de colesterol membranal sobre la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática del hepatocito.

### **➤ Objetivo particular.**

Analizar la posible asociación de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática del hepatocito, a dominios ricos en colesterol como balsas lipídicas y caveolas.

#### **IV. MATERIALES Y MÉTODOS.**

Las sales, amortiguadores y el compuesto metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) fueron adquiridos de Sigma Chemical Company. Los reactivos para el cultivo celular se obtuvieron de Gibco Invitrogen. La enzima colagenasa IV fue adquirida de Worthington. Los inhibidores de proteasas, así como la colágenasa I y la pronasa fueron proveídas por Roche. Para la determinación de proteína, se utilizó el sistema micro BCA de la marca Pierce. La detección de colesterol se determinó mediante el sistema fluorométrico Amplex Red Cholesterol Assay kit de la marca Invitrogen. Finalmente el anticuerpo general anti-PMCA clona 5F10 fue adquirida de la compañía Affinity Bioreagents, Inc.

##### **4.1 Aislamiento y cultivo de hepatocitos.**

Para el aislamiento de hepatocitos, se usaron ratas macho con un peso aproximado de 250 g las cuales fueron anestesiadas con ketamina (40-80 mg/Kg) y xilazina (5-10 mg/Kg) previo a la perfusión del hígado. Para la perfusión se usó solución fisiológica Krebs-Ringer (KR) y posteriormente se digirió el hígado con colagenasa IV al 0.05%, para disociar los hepatocitos de acuerdo con el protocolo de Berry 1969. Los hígados digeridos fueron centrifugados a 500 rpm durante 2 minutos, el sobrenadante resultante se desechó y las pastillas se recuperaron y lavaron varias veces con KR con el fin de aumentar la concentración de hepatocitos viables. Los hepatocitos fueron resuspendidos en KR y diluidos (v/v) en una solución isosmótica de Percoll (45 ml Percoll/4.5 ml de solución Hanks 10x y 0.5 ml de HEPES 1M) y se centrifugaron a 800 rpm por 5 minutos; las células se recuperaron de la pastilla y se sembraron en cajas de Petri de 10 cm de diámetro con medio de cultivo como se indica a continuación.

Los hepatocitos obtenidos se resuspendieron en medio Dulbecco`s modificado por Eagle`s (DMEM), suplementado con 0.02% con albúmina de suero bovino, HEPES 18 mM, piruvato de sodio 5 mM , bicarbonato de sodio 6 mM, 1 mg/ml de galactosa, prolina

30  $\mu$ M , L-glutamina 2 mM , 10% de suero de bovino fetal, 5  $\mu$ g/ml de insulina-transferrina-selenita de sodio (ITS), estreptomycin 100  $\mu$ g/ml, penicilina y gentamicina 100U/ml y 0.25  $\mu$ g de fungizona. Se sembraron una cantidad inicial de  $2.5 \times 10^6$  células, posteriormente se trataron por 3 horas en una atmósfera 5% de CO<sub>2</sub>/ 95% de aire atmosférico a una temperatura de 37°C. La viabilidad se estimó por el método de exclusión con azul tripán.

#### **4.2 Aislamiento de las membranas plasmáticas de hepatocitos.**

Las membranas plasmáticas fueron preparadas de acuerdo al método modificado de Mattingly y col. (Mattingly y col., 1992; Vázquez-Prado y col., 1997) usando hepatocitos frescos. Los hepatocitos fueron lisados en 0.5ml de un amortiguador con la siguiente composición: HEPES 20mM, EDTA 5mM, inhibidores de proteasas (PMSF 0.1 mM, inhibidor de tripsina 0.1 mg/ml, pepstatin A 0.1 mg/ml, leupeptina 0.1 mg/ml, antipain 0.1 mg/ml, benzamidina 0.1 mg/ml, aprotinina 0.1 mg/ml y  $\beta$ - glicerolfosfato 1 mM) durante 20 minutos a 4°C. Posteriormente los hepatocitos se homogenizaron con alrededor de 40 choques usando un homogenizador de teflón sobre hielo; el homogenizado se centrifugó a 1500 x g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se conservó y la pastilla se resuspendió de nuevo en el mismo amortiguador, la cual fue nuevamente homogenizada con 20 choques y centrifugada como se mencionó anteriormente. El segundo sobrenadante se mezcló con el primero y se centrifugó a 20,000 x g durante 20 minutos a 4°C. Dado que la pastilla contiene la fracción de las membranas, ésta se recuperó y resuspendió en un amortiguador de Tris-HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM pH 7.5, para ser guardadas a -70 °C hasta ser utilizadas.

### 4.3 Caracterización de la fracción obtenida de membranas plasmáticas de hepatocitos.

#### *Actividad enzimática de ATPasa de calcio en presencia de inhibidores específicos*

Para la caracterización de las membranas, se determinó la liberación de Pi a partir de ATP a 37°C en presencia de inhibidores específicos de otras ATPasas (Tabla 2): tapsigargina 1 µM/ml (en DMSO 0.5%) para SERCA, azida de sodio 1 mM para ATPsintetasa de membrana mitocondrial, ouabaina 0.5 mM para la ATPasa Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>. Se preincubaron 2.0 mg/ml de preparaciones de membranas durante 15 min. a 37°C con cada uno de los inhibidores. Los controles en ausencia de los compuestos fueron incubados en paralelo agregando solo el amortiguador (Tris-HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM a pH 7.5) y amortiguador + DMSO 0.5%, para experimentos con tapsigargina.

Al término de la preincubación con los inhibidores, las muestras se centrifugaron a 40,000 x g/30 min en un rotor TLS-55 posteriormente se retiró el sobrenadante, se recuperó la pastilla y se resuspendió al volumen inicial de las membranas con un amortiguador de Hepes 25 mM y MgCl<sub>2</sub> 10 mM pH 7.4 para las determinaciones de actividad de ATPasa. Dichas determinaciones se realizaron por triplicado mediante el método de Lanzetta usando, 50 µg de proteína (Lanzetta y col., 1979).

**Tabla II. Inhibidores específicos para diversas ATPasas.**

<b>Inhibidor</b>	<b>Proteína blanco</b>	<b>Ubicación</b>
Ouabaína 0.5 mM	ATPasa Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup>	Membrana plasmática
Azida de sodio 1mM	ATP sintetasa	Mitocondria
Tapsigargina 1 µM	SERCA	Retículo endoplásmico

#### *Actividad enzimática de ATPasa (Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup>).*

La actividad hidrolítica de la ATPasa (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>) fue determinada mediante modificaciones a la técnica descrita por Post (Post, y Sen, 1967). La reacción se inició adicionando 50 µg de proteína a la mezcla de reacción Imidazol-Glicilglicina pH 7.6 30 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, NaCl 100 mM, KCl 25 mM, ATP 4.5 mM, EGTA 0.1 mM en un volumen final de 400 µl. La mezcla fue incubada a 37 °C durante 15 min. La reacción se detuvo adicionando 100 µl de TCA al 10% que posteriormente se centrifugó a 3500 rpm en una centrifuga clínica durante 15 min. Finalmente se tomaron 300 µl del sobrenadante para la determinación de Pi mediante el método de Lanzetta (Lanzetta, 1969).

#### **4.4 Depleción del colesterol de la fracción de membranas plasmáticas.**

Para depletar de manera parcial el contenido de colesterol de las membranas plasmáticas de los hepatocitos, se utilizó el compuesto metil-β-ciclodextrina (MβCD) (Kilsdonk y col., 1995), del cual se preparó una solución madre a una concentración de 100 mM en agua desionizada que posteriormente se guardó en alícuotas a -20°C. Se incubaron alícuotas de membranas totales de hepatocitos por triplicado utilizando 25 µg de proteína por muestra, en un rango de concentraciones finales que fueron desde 0 hasta 10 mM de MβCD a 3 diferentes temperaturas de preincubación (25°, 37° y 50°C) durante 30 minutos. Los controles en ausencia del compuesto fueron incubados en paralelo agregando solo el amortiguador Tris-HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM pH 7.5 para completar un volumen final equivalente para todas las muestras. Al término de la preincubación con MβCD las muestras se centrifugaron a 40,000 x g/30 min en un rotor TLS-55, posteriormente se retiró el sobrenadante y se lavó la pastilla en el mismo amortiguador para centrifugar de nuevo como anteriormente se describió. Se recuperó la pastilla y se resuspendió al volumen inicial de las membranas con un amortiguador de Hepes 25 mM y MgCl<sub>2</sub> 10 mM (pH 7.4) para las determinaciones de actividad de ATPasa.

Las determinaciones de actividad específica se llevaron a cabo usando 25 µg de proteína por punto de ensayo, haciendo triplicados por concentración. La reacción enzimática a 37°C se inició agregando la siguiente mezcla de reacción: CaCl<sub>2</sub> 10µM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, MOPS pH 7.4 20 µM, KCl 250 µM, EGTA 1 mM y ATP 200 mM, que se detuvo a los 10 minutos. La cantidad de Pi liberado de la reacción se cuantificó mediante el método de Lanzetta (Lanzetta y col., 1979).

#### **4.5 Cuantificación de colesterol en la fracción membranal de hepatocitos.**

La cuantificación de colesterol se realizó en muestras de membranas tratadas con MβCD así como membranas sin tratamiento. Para ello se preparó una curva estándar de colesterol 0-8 µg/ml (0 a 20 µM) y se prepararon las muestras siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ésteres de colesterol son digeridos por la enzima colesterol esterasa para formar colesterol, el cual se oxida por la enzima colesterol oxidasa para formar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El peróxido es detectado con el compuesto 10-acetil-3, 7-dihidroxifenoxacina (reactivo Amplex) en una relación estequiométrica 1:1 en presencia de peroxidasa de rábano. La reacción se mide en un fluorómetro de placa marca Sinergy HT Biotek Instrument, Inc. en condiciones de excitación a 530 nm, y una emisión a 590 nm.

#### **4.6 Aislamiento de balsas lipídicas.**

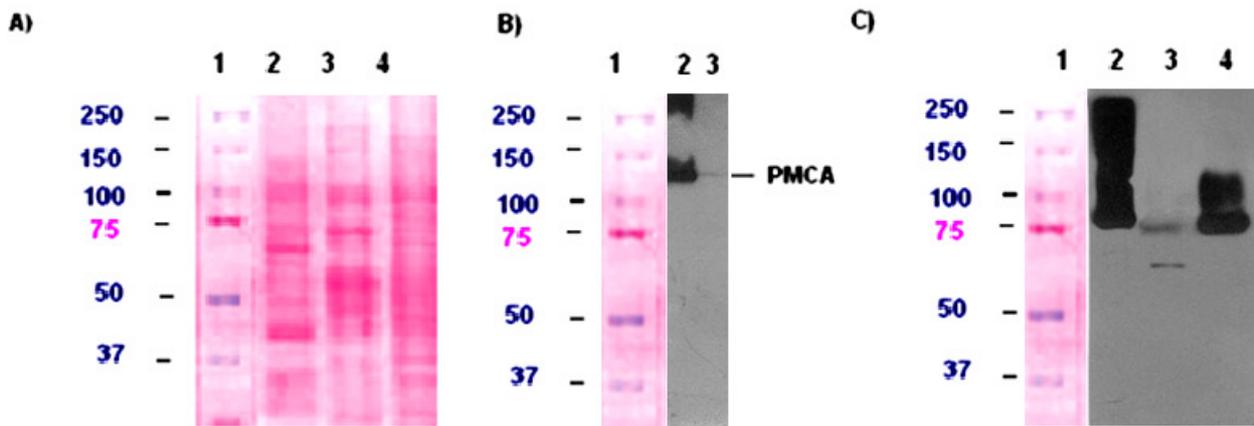
Las membranas resistentes a la solubilización con detergente se aislaron con base al método reportado por Gebreselassie (Gebreselassie y Bowen, 2004). Se usaron hígados previamente exanguinados los cuales se picaron con tijeras y después se homogenizaron en Ultraturrax. Partiendo de preparaciones de membranas de hígado total, las cuales fueron centrifugadas a 31,000 x g por 10 minutos. La pastilla obtenida fue solubilizada durante 60 minutos en amortiguador TKM (Tris HCl 50 mM pH8, KCl 25 mM, MgCl 5 mM y EDTA 1 mM) suplementado con Tritón X-100 a 1% en agitación suave. El lisado se centrifugó a 18,000 x g durante 10 minutos y se obtuvo el sobrenadante, el cual fue ajustado con sacarosa a 40%. Posteriormente se colocaron las membranas ajustadas en un gradiente de densidad de sacarosa 5 - 38%, para centrifugarse durante 21 horas a 135,000 x g en un rotor SW40. Las fracciones separadas, se colectaron del tubo de arriba hacia abajo y a cada fracción se le cuantificó proteína para determinar la actividad específica de PMCA y contenido de colesterol.

## **V. RESULTADOS**

### **5.1 Caracterización de la preparación de membranas.**

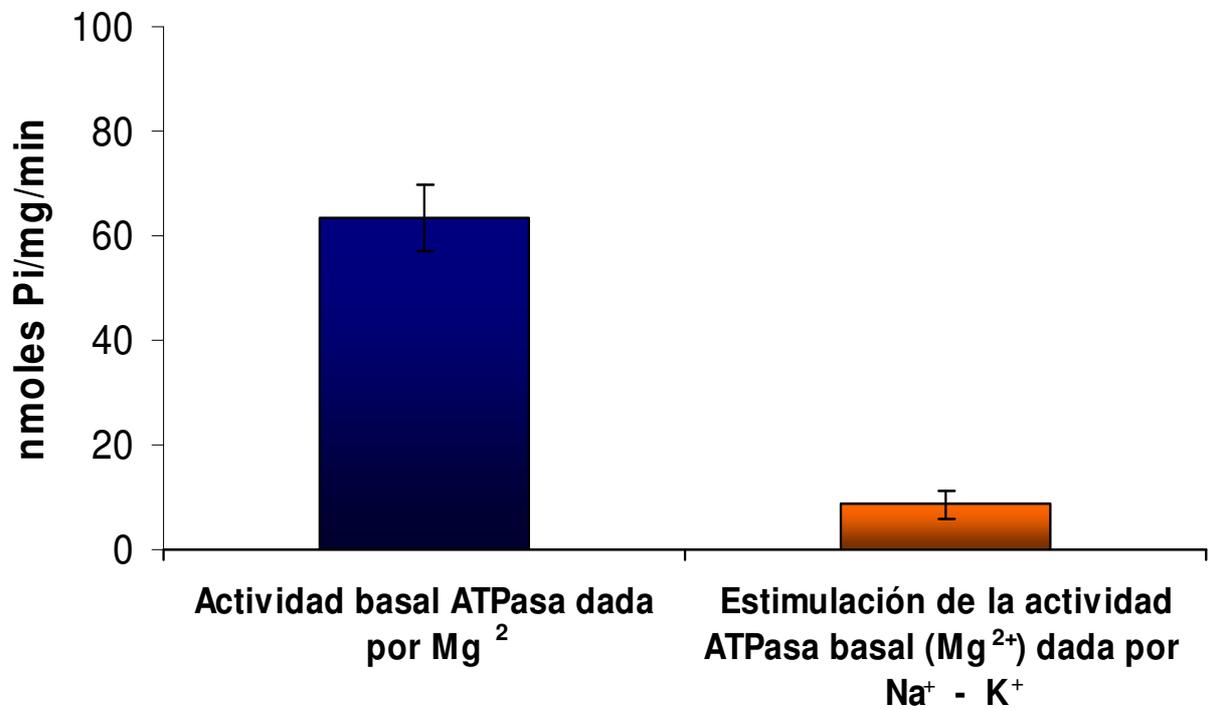
Las fracciones crudas de membranas de hepatocitos tuvieron una concentración promedio de 5 mg/ml de proteína. Una vez cuantificada la proteína de nuestras preparaciones, se determinó el grado de pureza y enriquecimiento de las mismas. La caracterización se realizó en primera instancia, mediante ensayos tipo Western blot en busca de marcadores específicos de membrana plasmática tales como: PMCA y ATPasa  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ . Se realizaron electroforesis en geles en condiciones desnaturizantes de poliacrilamida al 7.5 %, utilizando membranas plasmáticas de corazón y cerebro solubilizadas como controles positivos para detectar ATPasa  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ . En el caso de la detección de PMCA, se usó como control positivo enzima purificada de eritrocitos humanos (Fig. 6).

Como puede observarse en la tinción con rojo Ponceau de la figura 6.A, se obtuvo una adecuada transferencia de proteínas contenidas en la muestra cruda de membranas plasmáticas obtenida de los hepatocitos. Los ensayos tipo Western blot revelan la existencia de PMCA (Fig 6.B) y ATPasa  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  (Fig. 6.C), lo cual es el primer indicio de que los extractos crudos de membrana se encuentran enriquecidos por membrana plasmática.



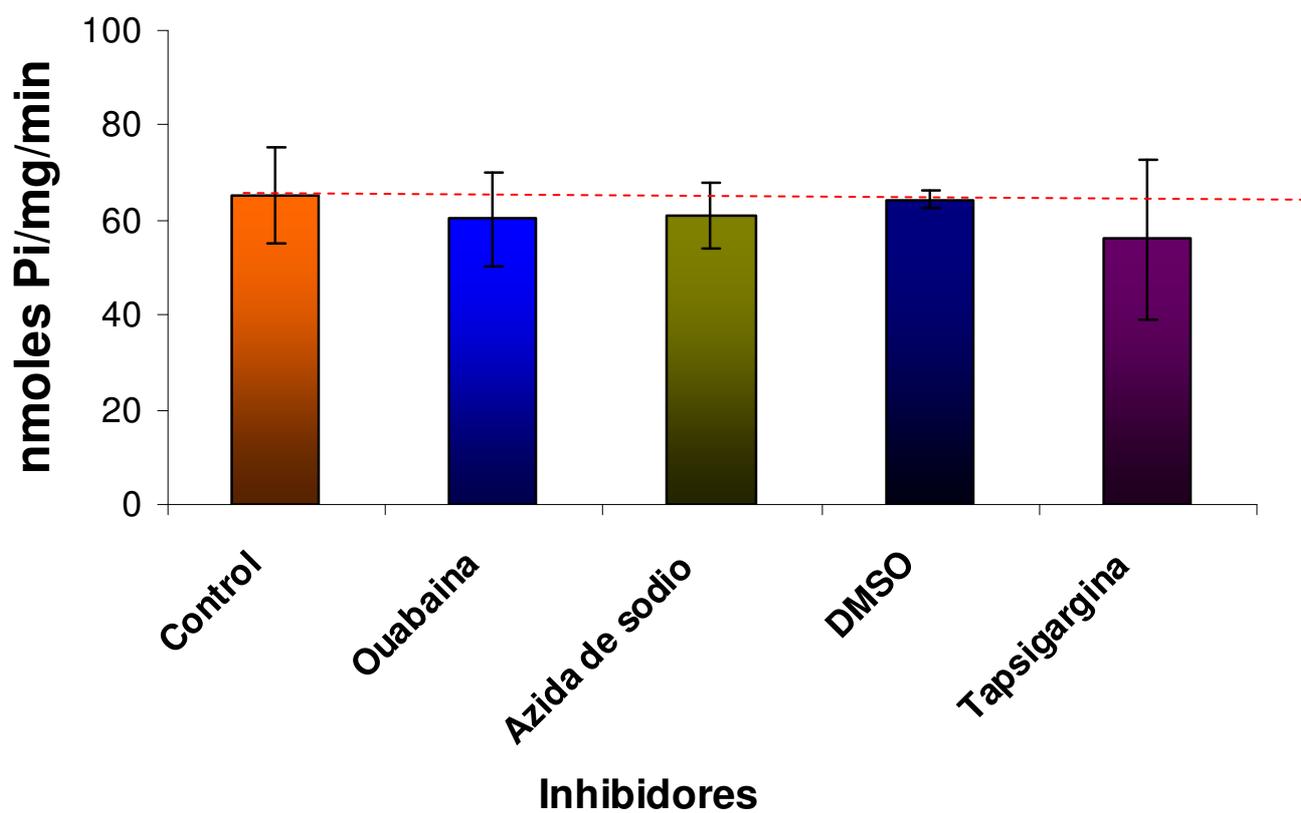
**Figura 6.** **A)** Membrana de nitrocelulosa teñida con rojo Ponceau mostrando la transferencia de proteínas en gels de poliacrilamida al 7.5%. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2 solubilizado de corazón, carril 3 solubilizado de hígado, carril 4 solubilizado de cerebro **B)** inmunoblot para la detección de PMCA; carril 1 marcador de peso molecular; carril 2 PMCA purificada de eritrocito humano, carril 3 solubilizado de hígado **C)** inmunoblot para la localización de ATPasa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ; carril 1 marcador de peso molecular; carril 2 solubilizado de cerebro, carril 3 solubilizado de hígado y carril 4 solubilizado de corazón. Por cada pozo se cargaron 20  $\mu\text{g}$  de solubilizado de proteína, los carriles con PMCA pura de eritrocitos se cargaron 2  $\mu\text{g}$  de proteína por pozo.

Paralelamente, se realizó la determinación de actividad específica de ATPasa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  y de ATPasa de  $\text{Mg}^{2+}$ ; los resultados se muestran en la figura 7. Nuestros datos demuestran la presencia de actividad enzimática de la ATPasa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  considerada como marcadora específica de membrana plasmática, lo que permite pensar que la preparación de membranas se encuentra enriquecida por membrana plasmática. Destaca que la actividad atribuible a la ATPasa de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  es solo una pequeña parte de la actividad basal dada por  $\text{Mg}^{2+}$ . De manera consistente, la actividad de ATPasa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  es coherente con el resultado obtenido en el Western blot para la detección de dicha enzima (Fig. 6.C).



**Figura 7.** Actividad específica de la ATPasa  $Na^+ - K^+$ . La barra azul corresponde a la actividad enzimática de la ATPasa de  $Mg^{2+}$ , la barra color naranja representa la actividad enzimática de  $Na^+ - K^+$ . Los resultados muestran el promedio de actividad específica de dos experimentos con 3 repeticiones cada uno  $\pm$  D.E.

Alternativamente, la contribución de membranas contaminantes en nuestra preparación se evaluó mediante la cuantificación de actividad específica de ATPasa de calcio en presencia de inhibidores específicos de ATPasas de diferentes membranas de organelos celulares. Por ejemplo; tapsigargina se usó como inhibidor de la ATPasa de retículo endoplásmico, azida de sodio como inhibidor de la ATP sintetasa y ouabaína como inhibidor de la bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ . En la figura 8 se presenta la actividad específica de ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  en presencia de los inhibidores. La barra control representa la actividad enzimática basal de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática, la cual fue considerada como el 100% de actividad. En presencia de ouabaína, se obtuvo un porcentaje de inhibición cercano a 8% sobre la actividad específica de la bomba de calcio; que indica que la contribución de actividad de la ATPasa de  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  es relativamente baja en las determinaciones de actividad específica de ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  y en concordancia con lo observado en las figuras 6.C y 7. El porcentaje de inhibición mostrado en presencia de azida de sodio fue alrededor de 7%, lo cual sugiere la presencia de membrana interna mitocondrial en nuestras preparaciones. La inhibición de 15% con tapsigargina demuestra el mayor grado de contaminación por membranas provenientes de retículo endoplásmico. Los resultados anteriores demuestran que las preparaciones de membrana plasmática de hepatocitos obtenidas se encuentran enriquecidas en marcadores de membrana plasmática con una proporción considerada dentro de lo aceptado en la literatura mundial por membranas de retículo endoplásmico y mitocondria (Mas-Oliva y col. 2007).



**Figura 8.** Actividad específica de ATPasa- $\text{Ca}^{2+}$  en membranas de hepatocitos de rata con diferentes inhibidores de ATPasas. Las preparaciones se incubaron con ouabaina 0.5 mM, azida de sodio 1 mM, tapsigargina  $1\mu\text{M}$  disuelta en DMSO al 0.5% y DMSO 0.5%. Los datos son el promedio de 2 experimentos de 3 repeticiones  $\pm$  D.E.

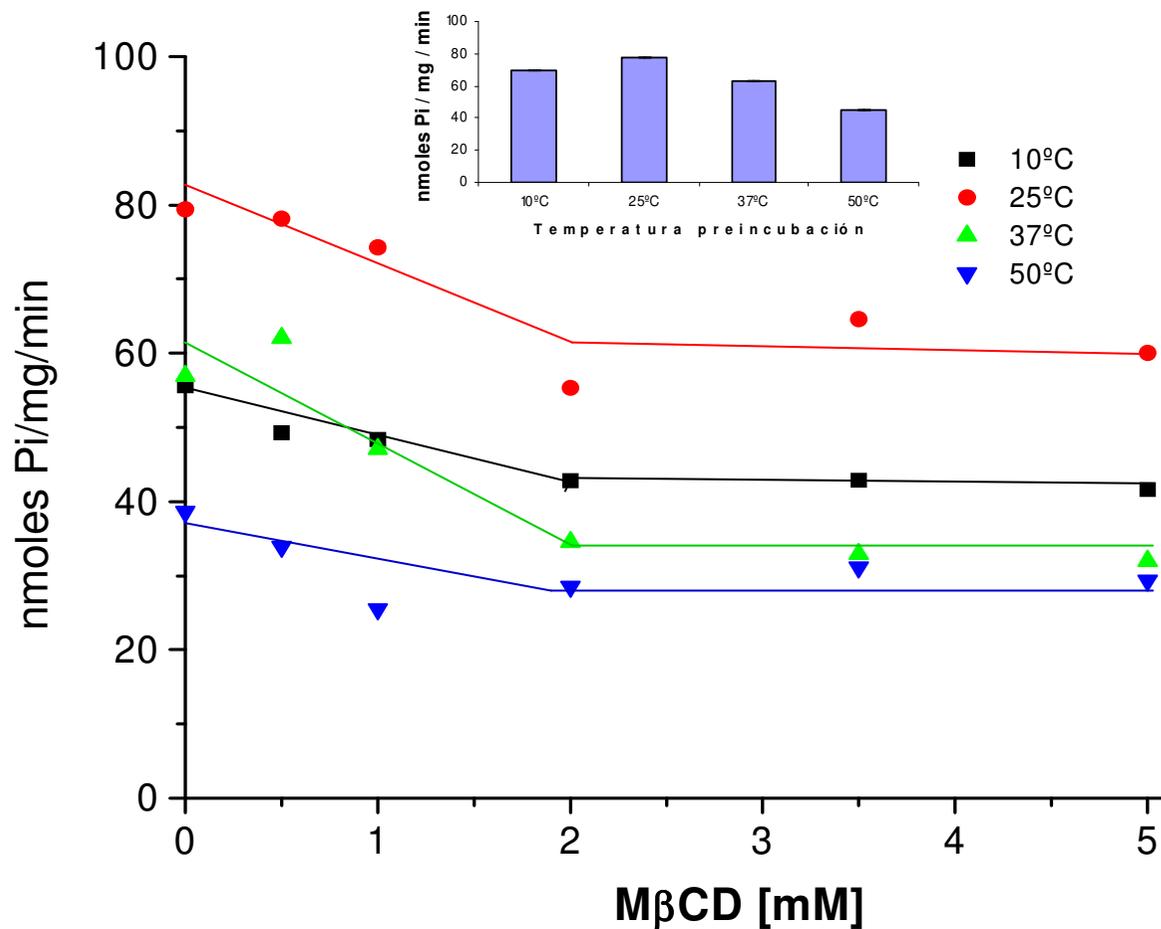
## 5.2 Efecto de M $\beta$ CD sobre la actividad enzimática de la ATPasa de Ca<sup>2+</sup> de la membrana plasmática de hepatocitos de hígado de rata.

El objetivo central de esta investigación consistió en analizar el efecto de la depleción parcial de colesterol membranal sobre la ATPasa de Ca<sup>2+</sup> de la membrana plasmática de hepatocitos de rata. Para dicho propósito utilizamos el compuesto metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) a concentraciones de 0 a 10 mM para retirar colesterol de las membranas plasmáticas. La cuantificación del colesterol de las membranas nativas tratadas con M $\beta$ CD se muestra en la Tabla III, donde se observa que no existe disminución aparente entre las concentraciones de colesterol de las membranas nativas y las membranas tratadas con concentraciones bajas de M $\beta$ CD. Sin embargo, se puede apreciar un cambio importante en el contenido de colesterol en las membranas tratadas con el compuesto a concentraciones superiores a 1 mM, alcanzando valores máximos de depleción cercanos al 90% de colesterol membranal en presencia de 10 mM de M $\beta$ CD.

**Tabla III. Cuantificación de colesterol de membranas nativas de hepatocitos con M $\beta$ CD.**

<b>Tratamiento M<math>\beta</math>CD</b>	<b>[<math>\mu</math>g/ml ] colesterol</b>	<b>% depleción</b>
control	43.77	0
0.75 mM	49.26	0
1 mM	36.0	17.80
2 mM	23.48	46.15
3.5 mM	22.60	48.0
5 mM	20.24	53.73
10 mM	5.99	86.31

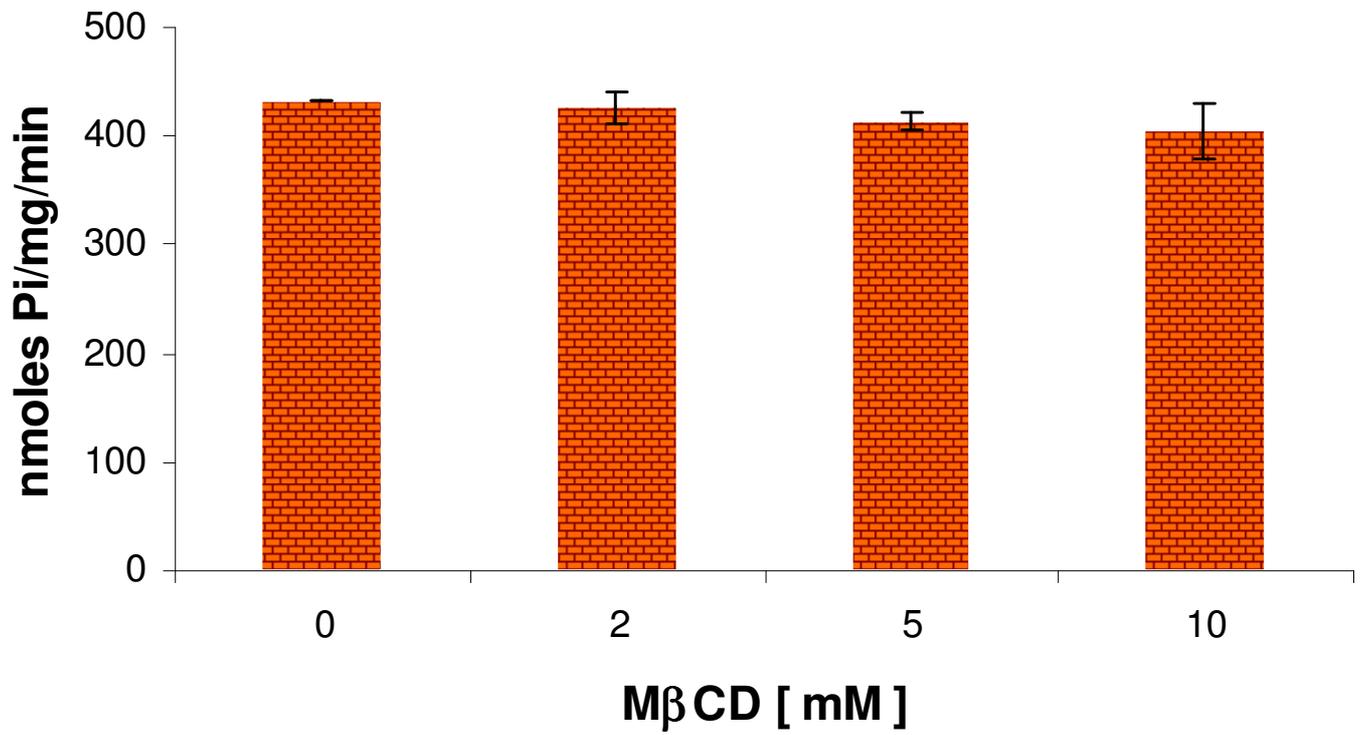
Los ensayos de actividad enzimática fueron efectuados a 4 diferentes temperaturas de preincubación, los resultados se muestran en la Fig. 9.



**Figura 9.** Efecto de  $M\beta CD$  sobre la actividad de PMCA de hepatocitos con diferentes temperaturas de preincubación. Las preparaciones se preincubaron durante 30 minutos a 10 °C, 25 °C, 37 °C y 50 °C; al término de la preincubación, se centrifugaron las membranas y se resuspendieron en amortiguador HEPES 25 mM y  $MgCl_2$  10 mM pH 7.4. para posteriormente llevar a cabo la determinación de actividad específica. La gráfica representa el promedio de tres experimentos independientes para cada temperatura de preincubación. En el recuadro se muestra la actividad específica de PMCA en un experimento independiente realizado a las diferentes temperaturas de preincubación en ausencia de  $M\beta CD$ .

La figura 9 muestra un comportamiento bifásico de la enzima; donde se observa que a concentraciones entre 0.5 y 2 mM de M $\beta$ CD la actividad de la PMCA decae abruptamente alcanzando un valor máximo de inhibición cercano a 40% en relación directa con el contenido de colesterol remanente en las membranas (Tabla III). A concentraciones de M $\beta$ CD mayores a 2 mM la actividad alcanza una meseta que se mantiene constante aún después de tratar las membranas con 10 mM de M $\beta$ CD (datos no mostrados), lo cual puede implicar que la PMCA requiere de una concentración específica de moléculas de colesterol que normalmente regula la actividad de la enzima. El fenómeno se repitió en las cuatro condiciones de preincubación, no obstante, la actividad de ATPasa siempre fue mayor a 25°C respecto a las demás temperaturas probadas. Nuestras observaciones se corroboraron mediante un ensayo de cinética en el cual se puede observar que la temperatura afecta la actividad basal de la ATPasa de Ca<sup>2+</sup> (inserto Fig. 9).

Con el fin de mostrar si la depleción de colesterol mediada por M $\beta$ CD en sarcolema cardiaco se traduce en una disminución importante en la actividad de ATPasa, se realizaron una serie de experimentos preincubando a 37°C como se muestra en la Figura 10, donde se observa que el efecto del tratamiento con M $\beta$ CD sobre la actividad de PMCA es inexistente en comparación con lo observado en membranas de hepatocitos.



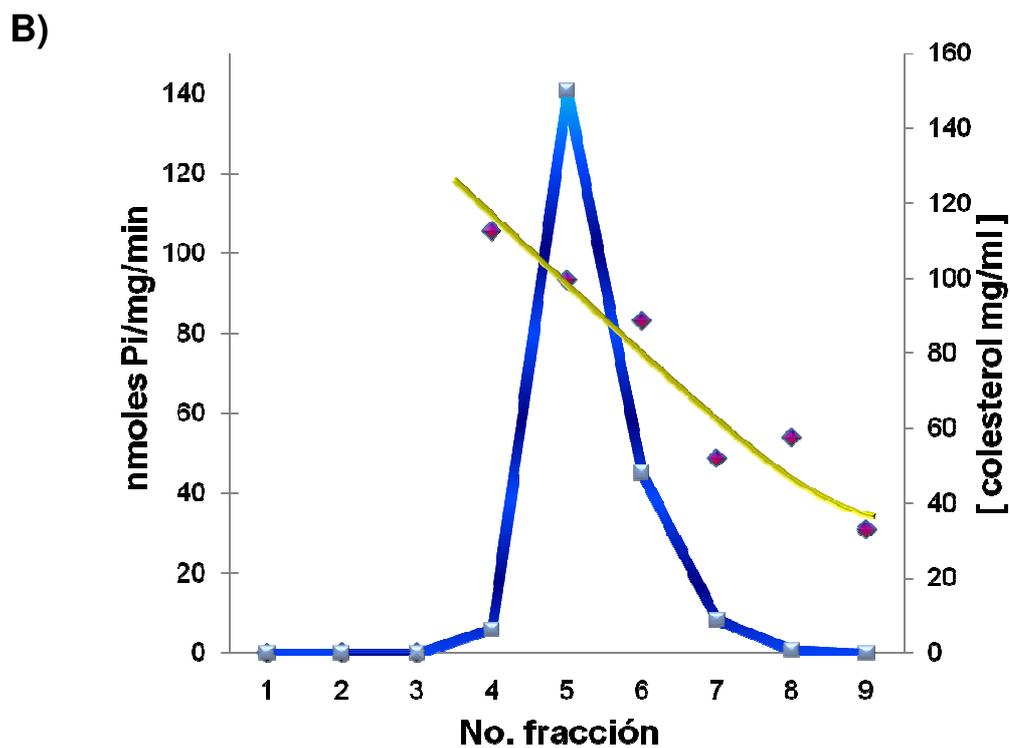
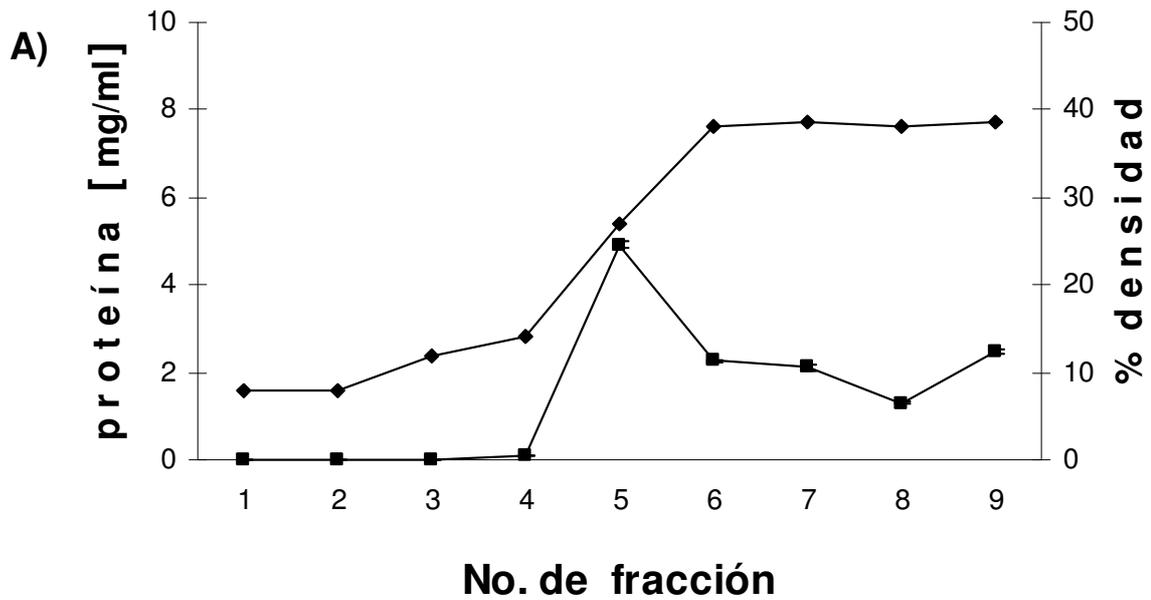
**Figura 10.** Actividad específica de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática de sarcolema cardíaco posterior a la depleción de colesterol con  $\text{M}\beta\text{CD}$ . La gráfica muestra el promedio de tres experimentos  $\pm$  D.E.

### **5.3 Asociación de PMCA a membranas resistentes a detergentes (DRMs).**

Previamente hemos mostrado que la PMCA de hepatocitos depende de concentraciones altas de colesterol membranal para poder alcanzar su máxima capacidad catalítica (Fig. 9), fenómeno en cual podría sugerir su posible localización dentro de dominios ricos en colesterol como son las caveolas y las balsas lipídicas. Las balsas lipídicas pueden ser aisladas de diferentes tipos celulares a bajas temperaturas y con base a su insolubilidad en detergentes no iónicos, como es el caso del Tritón X-100 y a su separación en fracciones con gradientes discontinuos de sacarosa. El concepto general de balsa lipídica radica en ser en esencia, una región de la membrana resistente a la solubilización con detergentes no iónicos, con alto contenido de colesterol asociado a proteínas específicas y glucosilfosfatidilinositol, los cuales se colocan a bajas densidades de sacarosa. En la figura 11 se muestra la caracterización general de las fracciones de membranas incubadas con Tritón X-100 y separadas en un gradiente de sacarosa.

En la figura 11. A se observa que la fracción 5 contiene el mayor contenido de proteína de todas las fracciones, el valor de densidad para tal fracción corresponde a 28% de sacarosa.

Por otra parte, se puede observar se puede observar que en las fracciones de baja densidad (4-5), la actividad de PMCA se encuentra mayormente enriquecida (Fig. 11. B). Asimismo, la fracción 5 muestra la mayor concentración de colesterol coincidiendo con una de las fracciones con mayor actividad (Fig. 11. B).



**Figura 11.** Caracterización de las fracciones del gradiente de densidad de sacarosa. **A)** Perfil proteínico de las fracciones resistentes a Tritón X-100 (■), concentración de sacarosa de las fracciones determinada por refractómetro (◆). **B)** Actividad de PMCA (■) y concentración de colesterol (◆) obtenida del gradiente de densidad de sacarosa. La determinación de actividad se realizó con 50 µg de proteína de cada fracción. Experimento representativo.

## VI. DISCUSIÓN

Los experimentos llevados a cabo con membranas parcialmente depletadas de colesterol utilizando M $\beta$ CD muestran a las diferentes temperaturas probadas, que la actividad de PMCA disminuye abruptamente cuando la concentración de M $\beta$ CD corresponde a 1 mM (Fig. 9). Este dato correlaciona directamente con la depleción de colesterol en estas membranas (Tabla III). Un dato sobresaliente corresponde a lo observado a 25°C, donde la actividad siempre es mayor que en el resto de las temperaturas utilizadas durante la preincubación de las membranas con el compuesto. A este respecto, es interesante discutir que muy probablemente este fenómeno pudiera estar poco relacionado con la temperatura de transición de las membranas en estudio. Consideramos que las diferencias catalíticas iniciales de la enzima contenida en membranas preincubadas a diversas temperaturas, puedan estar relacionadas con aspectos de termoestabilidad de la PMCA. Aparentemente, la mayor actividad catalítica de la PMCA está dada cuando las membranas son incubadas a 25°C. Temperaturas por arriba o por abajo de ésta pudieran estar alterando la estabilidad de la enzima. Si consideramos que la temperatura de transición de estas membranas en relación con estudios realizados con otras preparaciones membranales pudiera estar cercana a los 25°C (Mas-Oliva y Delgado-Coello, 2007), es interesante observar que el compuesto, independientemente del estado de transición de fase de las membranas, se ejerce una tendencia inhibitoria similar. Esto último podría apoyar la tesis de la inclusión de la PMCA en balsas lipídicas las cuales son relativamente estables y resistentes a cambios físicos dados por la temperatura. Consideramos que si la PMCA se encontrara en la poza general de la membrana, la preincubación a las diferentes temperaturas hubieran afectado de manera diferencial la actividad de la ATPasa, resultado que muy probablemente hubiera estado asociado a la capacidad de interacción del compuesto con

la membrana en condiciones físicas diferentes, dependiendo de las temperaturas utilizadas por abajo o por arriba de la temperatura de transición. En general, esto nos hablaría de que las diferencias en el empaquetamiento de los lípidos en las membranas habrían alterado directamente la interacción del compuesto con ellas. Sin embargo, al no ser este el caso, muy probablemente la PMCA está contenida en regiones membranales que no siguen esta regla y por consiguiente, directamente correlacionada con las balsas lipídicas.

Por lo tanto, el efecto inicial en la actividad de la PMCA en ausencia del compuesto, muy probablemente está relacionada con un fenómeno de termoestabilidad de la enzima.

La observación de una mayor actividad a 25°C parece estar estrechamente relacionada con una remoción de colesterol menos eficiente por M $\beta$ CD como se mostró por la cuantificación del colesterol remanente que fue mayor que a 37°C (datos no mostrados). La mayor parte de los estudios que usan M $\beta$ CD como agente secuestrador de colesterol lo usan a 37°C. Sin embargo, un reciente trabajo reporta el tratamiento en temperaturas de incubación a 0°C y 37°C y en concordancia con lo observado por nosotros, a 0°C en presencia de M $\beta$ CD en concentraciones tan altas como 120 mM, sólo se alcanza un 35% de depleción de colesterol (Mahammad y Parmryd 2008). En dicho trabajo se demostró además que el M $\beta$ CD es capaz de secuestrar colesterol de manera inespecífica, es decir, tanto de balsas lipídicas como de pozas intracelulares y que ocurre una intensa movilización del colesterol de estas últimas hacia la membrana plasmática (Mahammad y Parmryd, 2008).

Con base a nuestros anteriores resultados, consideramos muy importante abordar la posible alteración de las balsas lipídicas debido a la remoción de colesterol en las células hepáticas, además de la posible ubicación de la PMCA en estos dominios.

Trabajos previos han permitido la caracterización de dos tipos de dominios ricos en caveolinas en el hígado: una soluble en tritón X-100 aparentemente asociada de manera constitutiva al citoesqueleto, y una insoluble en tritón X-100 que se encuentra en las fracciones ligeras de un gradiente de densidad DRM/rafts (Balbis y col., 2004). También se ha demostrado que el tratamiento con M $\beta$ CD en hepatocitos desintegra balsas lipídicas (Nagata y col. 2007) y libera proteínas asociadas a estos dominios en otros tipos celulares (Keller y col. 1998). En experimentos con pares de hepatocitos en cultivo que conservan sus propiedades de polaridad, tratados con M $\beta$ CD (5 mM a 37°C/30 min) se ha demostrado que la tinción con filipina desaparece y la caveolina se redistribuye desde la membrana canalicular a la membrana plasmática completa (Nagata y col. 2007).

Por otro lado, a pesar de que se sabe que en los hepatocitos existen balsas lipídicas, no se tiene ningún antecedente de la distribución de PMCA en células hepáticas en estos dominios. Por ello, procedimos al aislamiento de estos dominios y pudimos demostrar la posible asociación de la actividad de PMCA con fracciones de baja densidad y alto contenido de colesterol, es decir, la asociación de la ATPasa a dominios tipo balsa lipídica. La caracterización preliminar de nuestra preparación coincide con datos obtenidos en otros tipos celulares (Sepúlveda y col., 2006; Jiang y col., 2007). Nuestros resultados concuerdan con lo reportado para neuronas en cultivo cuya síntesis de colesterol fue reducida por inhibición de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoAR), reduciendo a su vez los niveles de colesterol en las membranas plasmáticas. Asimismo, en este trabajo se observó la mayor actividad de PMCA en fracciones con alto contenido de colesterol obtenidas de un gradiente de sacarosa para obtención de dominios tipo balsas lipídicas. En contraste, las fracciones obtenidas de células inhibidas en su síntesis de colesterol la actividad disminuyó sensiblemente (Jiang y col., 2007). De manera análoga, la concentración de proteína en estas fracciones fue menor pero la

concentración de PMCA fue mayor. Interesantemente, se ha reportado que la ATPasa no asociada a balsas lipídicas no sufre efecto en su actividad (Jiang y col., 2007).

De acuerdo a lo reportado en la literatura para otros tejidos, es bastante probable que distintas isoformas de PMCA y subtipos de esta proteína en el tejido hepático tengan preferencia intrínseca por dominios de balsas lipídicas y que asimismo, las que no se asocian a estos dominios, puedan seguir funcionando aún cuando disminuya la concentración de colesterol membranal (probablemente esto explique lo observado en la Fig. 9 donde la actividad de ATPasa se mantiene estable en concentraciones de M $\beta$ CD  $\geq$  2mM).

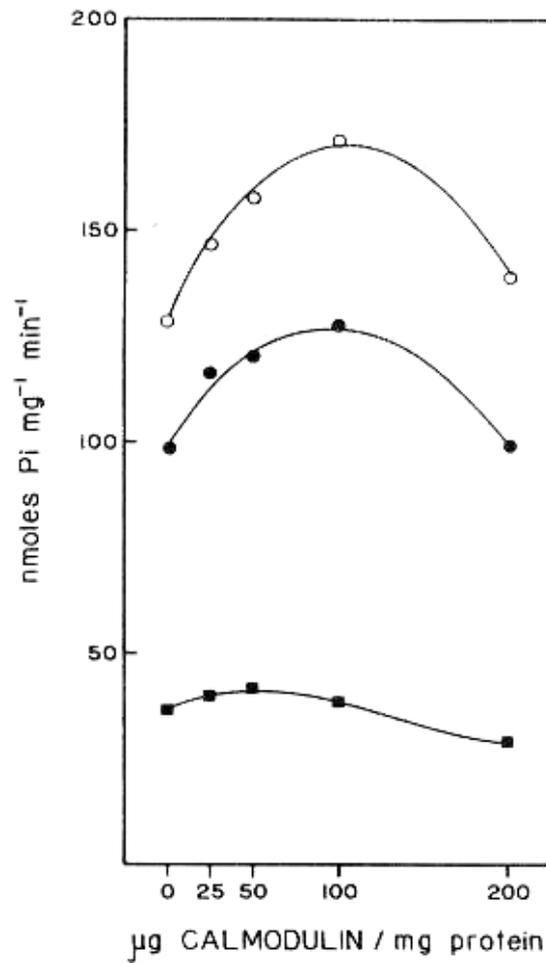
Una interpretación adicional de los resultados, puede ser que dentro de la topología de la enzima hepática exista algún dominio de interacción directa con colesterol con capacidad de regulación de la actividad enzimática con características análogas a las exhibidas por el dominio de unión a fosfolípidos. Recientemente se han descrito algunas proteínas de membrana que contienen una secuencia consenso unidora de colesterol membranal, tales motivos son denominados CRAC (colesterol recognition/interaction amino acid consensus) y se les ha considerado como factores de segregación de proteínas dentro de balsas lipídicas y caveolas (Epanand, 2006). Interesantemente, la gran mayoría de las proteínas ubicadas dentro de dominios ricos en colesterol como son: caveolinas, glicoproteínas virales y receptores a factores de crecimiento entre otras, poseen alguna especie de dominio CRAC (Epanand, 2006). Específicamente en sinaptosomas de cerebelo se ha reportado que la isoforma 4 de PMCA también posee este tipo de dominios (Sepulveda, y col. 2006).

## ***Análisis de las diferencias en la dependencia al colesterol en membranas hepáticas y de sarcolema cardiaco***

El papel que el colesterol puede desempeñar en la regulación de las ATPasas de  $\text{Ca}^{2+}$  se ha estudiado previamente en nuestro laboratorio (Ortega y Mas-Oliva, 1984; Mas-Oliva y Santiago-García 1990; Ortega y col. 1996; Santiago-García y col. 2000; Mas-Oliva y col. 2007). Así mismo las investigaciones realizadas con anterioridad en nuestro laboratorio utilizando suero inactivado libre de colesterol y fosfolípidos para depletar colesterol de acuerdo al método de Shinitzky (Shinitzky, 1978), muestra que la actividad catalítica de la bomba de músculo cardiaco aumenta significativamente (Fig. 12).

Sin ser parte central de discusión en este trabajo, es interesante el efecto inexistente de la depleción de colesterol con M $\beta$ CD sobre la actividad catalítica de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  de sarcolema cardiaco (Fig. 10). La disminución de la actividad de la ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de membranas de hepatocitos con bajo contenido en colesterol (Fig. 9), contrasta con lo reportado para la PMCA de fantasmas de eritrocitos y membranas de sarcolema cardiaco en donde el efecto de la depleción de colesterol mediante otros esquemas metodológicos produce un incremento de la actividad catalítica de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  (Lijnen y Petrov, 1995; Ortega y Mas-Oliva, 1984). El mismo efecto se ha demostrado para la ATPasa de  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  de riñón de bovino en donde aparentemente altas concentraciones de colesterol en la membrana inhiben la actividad hidrolítica de ATP y bajas concentraciones de colesterol producen un incremento en la actividad catalítica de la enzima (Yeagle y col. 1988). En su momento estos hallazgos se atribuyeron a que el colesterol provoca cambios en las propiedades fisico-químicas de la membrana relacionadas con: fluidez de los lípidos membranales, grosor, permeabilidad y finalmente una posible interacción directa del colesterol con la proteína (Ortega y Mas-Oliva, 1984; Yeagle y col. 1988). En principio, el colesterol podría formar parte intrínseca en la

estructura de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ , permitiéndole adoptar su conformación biológica funcional por medio de la modulación de los estados conformacionales de alta afinidad o baja afinidad. Numerosos reportes indican que el colesterol puede ser efectivo en la modulación de estos cambios conformacionales en gran cantidad de proteínas de membrana (Yeagle y col. 1988; Ortega y Mas-Oliva, 1984; Dalziel y col. 1980). Debido a lo inesperado de nuestras observaciones en membranas de hepatocitos en relación con nuestros hallazgos previos, decidimos probar el efecto de M $\beta$ CD en membranas de sarcolema cardiaco bovino, donde no encontramos efecto sobre la actividad catalítica de la PMCA (Fig. 10). Una investigación reciente realizada en sarcolema cardiaco, mostró que PMCA y otras proteínas de membrana (ATPasa  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  y NCX) no se asocian aparentemente a balsas lipídicas, lo cual podría explicar parcialmente lo observado en membranas de sarcolema (Cavalli y col., 2007). Esta posibilidad es apoyada por la observación en experimentos realizados con neuronas mediante depleción de colesterol por inhibición de la vía del mevalonato, donde se demostró claramente que aquellas variantes de PMCA que no se asocian a balsas lipídicas, no muestran efectos en su actividad debido al tratamiento (Jiang 2007). Adicionalmente, el análisis de la posible presencia de secuencias CRAC en las diferentes isoformas de PMCA en sarcolema podrá dar soporte adicional para explicar lo observado.



**Figura 12.** Actividad específica de ATPasa de calcio de membrana plasmática de sarcolema cardíaco activada por calmodulina. ● Membranas sin tratamiento, ○ membranas depletadas de colesterol, ■ membranas suplementadas con colesterol. Imagen obtenida de Ortega y Mas-Oliva. 1986.

## VII. CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se ha determinado por primera vez en el hígado, que la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática depende de las concentraciones de colesterol que le rodean para su óptimo funcionamiento. La disminución de la actividad de PMCA observada en el hepatocito en condiciones de bajo colesterol, así como su ubicación dentro de fracciones ricas en colesterol resistentes a solubilización con Tritón X-100 sugieren que la PMCA se asocia a dominios ricos en colesterol y por tanto, explicaría de manera directa la estrecha dependencia de PMCA del ambiente lipídico que le rodea, en especial del colesterol. En el tejido hepático, el colesterol en la membrana puede desempeñar el papel de regulador de diversos procesos metabólicos, pues se ha determinado que bajo condiciones de proliferación celular (regeneración hepática y cáncer hepático) en donde los flujos de calcio inciden en la activación de múltiples procesos celulares, el nivel de colesterol en la membrana plasmática del hepatocito decae considerablemente (Bruscalupi y col. 1980; Muriel y Mourelle, 1990; Kohmoto y col. 1994).

Por otro lado, la relevancia fisiológica de la localización de PMCA en dominios ricos en colesterol tanto en tejidos excitables como en no excitables aun no ha sido elucidada. Posiblemente el arreglo temporal de la bomba de calcio en dominios ricos en colesterol, en conjunto con otros receptores y proteínas de membrana, permiten el ensamble de cascadas de señalización en respuesta a un estímulo extracelular. En el caso específico del hígado, existen una gran variedad de procesos dependientes de calcio que ocurren en lapsos temporales acoplados a las necesidades de la célula, como son: el metabolismo de glucógeno, contracción de los canalículos biliares, proliferación celular, regeneración hepática, expresión genética, secreción biliar, arreglo del citoesqueleto, entre otros. Con objeto de estudiar en mayor detalle este fenómeno, será necesario en un futuro inmediato realizar el análisis fino del efecto de M $\beta$ CD en fracciones membranales asociadas a

colesterol como son balsas lipídicas y caveolas. Además, la detallada caracterización de isoformas específicas de PMCA y de marcadores específicos de proteínas asociadas a balsas lipídicas y/o a caveolas.

## **VIII. CONCLUSIONES.**

1. La ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática de hígado de rata posee fuerte dependencia por su entorno lipídico.
2. La disminución de la concentración de colesterol llevada a cabo por el compuesto M $\beta$ CD en preparaciones de membrana plasmática de hígado, disminuye la capacidad de hidrólisis de ATP de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$ .
3. La ATPasa de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática del hepatocito aparentemente se asocia a dominios enriquecidos de colesterol como balsas lipídicas y caveolas.
4. La PMCA de la membrana plasmática de músculo cardiaco, a comparación con la localizada en el hepatocito, no es sensible a la disminución en la concentración de colesterol membranal.

## IX. BIBLIOGRAFÍA.

1. Aloia C. R. and Boggs M. J. (1985). Membrane fluidity in biology Vol. 4 Ed. Academic Press, Inc pp 104-142. Orlando Florida E.U.A.
2. Allen, G. B., Katz, S., Roufogalis D. B. (1987). Effects of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and calmodulin on the formation and decomposition of the phosphorylated intermediate of the erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulated ATPase. *J Biochem* 244: 617-623.
3. Anderson, R G. W (1993). Plasmalemma caveolae and GPI-anchored membrane proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 5: 647-652.
4. Balbis, A., Baquiran, G., Mounier, C., and Posner I., B. (2004). Effect of insulin on Caveolin-enriched membrane domains in rat liver. *J Biol Chem* 279: 39348-39358.
5. Benaim, G., Zurini, M. and 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.
6. Berry, M. N and Friend, D. S. (1969). High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 43: 506-520.
7. Brown, E. R. (1998). Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal. *J Cell Science* 111: 11-9.

- 8.** Bruscalupi, G., Curatola, G., Leoni, S., Mangiantini, M.T., Mazzanti, L., Spagnuolo, S. and Trentalance, A (1980). Plasma membrane changes associated with rat liver regeneration. *Biochim Biophys Acta* 683: 279-301.
- 9.** Calvo, M., Tebar, F., Lopez-Iglesias, C. and Enrich, C. Morphologic and functional characterization of caveolae in rat liver hepatocytes. *Hepatology* 33: 1259- 1269.
- 10.** Carafoli, E. (1992). The  $\text{Ca}^{2+}$  pump of the plasma membrane. *J Biol Chem* 267:2115-2118.
- 11.** Carafoli, E., and Guerini, D. (1997). The plasma membrane calcium pump en: Calcium and Cellular Metabolism. Sotelo, J.R. and Benech, J. C. (eds). Transport and Regulation. Plenum Press, New York.
- 12.** Caroni, P. and Carafoli, E., (1981). Regulation of  $\text{Ca}^{2+}$  pumping ATPase of heart sarcolemma by a phosphorylation-dephosphorylation Process. *J Biol Chem* 256: 9371-9373.
- 13.** Cavalli, A., Eghbali, M., Minosyan, M., Stefani, E. and Phillipson, D. K. (2007) Localization of sarcolemmal proteins to lipid rafts in the myocardium. *Cell Calcium* 42: 313-322.
- 14.** Dalziel, W., Rollins, E. S and McNamee (1980). The effect of cholesterol on agonist-induced flux in reconstituted acetylcholine receptor. *FEBS Lett.* 122: 193- 196.

**15.**Delgado-Coello, B. and Mas-Oliva J. (1996). Lead affects the formation of the phosphorylated intermediate on the  $(Ca^{+2} -Mg^{+2})$ -ATPase from erythrocytes. *Med Sci Res* 24: 159-161.

**16.**Delgado-Coello, B., Trejo R. and Mas-Oliva J. (2006). Is there a specific role for the plasma membrane  $Ca^{2+}$ - ATPase in the hepatocyte? *Mol Cell Biochem* 285: 1-15.

**17.**Delgado-Coello, B., Santiago- García , J., Zarain- Herzberg, A. and Mas-Oliva, J. (2003). Plasma membrane  $Ca^{2+}$ - ATPase mRNA expression in murine hepatocarcinoma and regenerating liver cells. *Mol Cell Biochem* 247: 177-184.

**18.**Domi, Teuta, Di Leva Francesca, Fedrizzi Laura, Rimessi Alessandro and Brini Marisa (2007) Functional Specificity of PMCA isoforms? *Ann NY Acad Sci* 1099: 237-246.

**19.**De Meis, L., and Alves, G., G. 2004. Los compuestos de fosfato de alta energía y baja energía. *Mensaje Bioquímico Vol. XXVIII*.

**20.**De Meis, L., Otero de Souza, A., Martins B. O. and Alves, W. E. (1981). Phosphorylation of sarcoplasmic reticulum ATPase by orthophosphate in the absence of  $Ca^{2+}$  gradient. *J Biol Chem* 257: 4993-4998.

**21.**Edidin, M. (2003). The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 32: 257-283.

- 22.**Epand, R. M. (2006) Cholesterol and the interaction of proteins with membrane domains. *Prog Lipid Res* 45: 279-294.
- 23.**Falchetto, R., Vorherr, T., Brunner, J., and Carafoli, E. (1991). The plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump contains a site that interacts with its calmodulin-binding domain. *J Biol Chem* 266: 2930-2936.
- 24.**Fielding, C.J. and Fielding, P. E. (2000). Cholesterol and caveolae: structural and functional relationships. *Biochim Biophys Acta* 1610: 219-228.
- 25.**Fujimoto T. (1993). Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J Cell Biol* 120: 1147-1157.
- 26.**Gebreselassie D. and Bowen D., W. (2004). Sigma-2 receptors are specifically localized to lipid rafts in rat liver membranes. *Eur J Pharmacol* 493: 19-28.
- 27.**Gier D. J., Mandersloot G. J., Deenen Van., L. L. M., (1969). The role of cholesterol in lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* 173: 143-145.
- 28.**Graf, E., and Penniston, J. T. (1981). Equimolar interaction between calmodulin and the  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase from erythrocyte membranes. *Arch Biochem Biophys* 210: 256-262.
- 29.**Hammes, A., Oberdorf, S., Streheler, E., Stauffer, T., Carafoli, E., Vetter, H. and Neyses, L. (1994). Differentiation-specific isoform mRNA expression of the calmodulin-dependent plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase. *J. FASEB* 8: 428-435.

- 30.**Heller, H., Schaefer M. and Schulten, K. (1993). Molecular dynamics simulation of a bilayer of 200 lipids in the gel and in the liquid-crystal phases. *J Phys Chem* 97: 8343-8360.
- 31.**Harder, T. and Simons K. (1997). Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* 9: 534-542.
- 32.**Howard, A., Barley, F. N., Legon, S. and Walters, F. R. J. (1994). Plasma-membrane calcium-pump isoforms in human and rat liver. *J. Biochem* 303: 275-279.
- 33.**Isshiki, M. and Anderson, W. G. R. (2003). Function of caveolae in Ca<sup>2+</sup> -dependent signal transduction. *J Traffic* 4: 717-723.
- 34.**James, P., Maeda, M., Fischer, R., Verma K. A., Krebs, J., Penniston, T., J., and Carafoli, E. (1988). Identification and primary structure of a Calmodulin binding domain of the Ca<sup>2+</sup> pump of human erythrocytes. *J Biol Chem* 263: 2905-2910.
- 35.**Jiang, L., Fernandes, D., Mehta, N., Bean, L. J., Michaelis, M. L., and Zaidi, A. (2007). Partitioning of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> -ATPase into lipid rafts in primary neurons: effects of cholesterol depletion. *J Neurochemistry* 102: 378-388.
- 36.**Jouneaux, C., Audigier, Y., Goldsmith, P., Pecker, F., and Lotersztajn S. (1993). G<sub>s</sub> mediates hormonal inhibition of the calcium pump in liver plasma membranes. *J Biol Chem* 268: 2368-2372.

- 37.**Kanauf, A, P, Proverbio, F., and Hoffman, J. F. (1974). Electrophoretic separation of different phosphoproteins associated with Ca-ATPase and N-K-ATPase in human red cell ghosts *J General Physiology* 63: 324-336.
- 38.**Keeton, T.P., and Shull, E. G. (1993). Primary structure of rat plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPase isoform and analysis of alternative splicing patterns at splice site A. *J Biochem* 306: 779-785.
- 39.**Kessler, F., Bennardini F., Bachs, O., Serratosa, J., James P., Caride J. A., Gazzotti P., Penniston, T. J. and Carafoli, E. (1990). Partial purification and characterization of the Ca<sup>2+</sup>-pumping ATPase of the liver plasma membrane. *J Biol Chem* 265: 16012-16019.
- 40.**Keller, P. and Simons, K. (1998). Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *J. Cell Biol.* 140: 1357-1367.
- 41.**Kohmoto, M., Tanaka, J., Yoshida, M., Kasamatsu, T., Fujita, K. I., Zhong, W. B., Kaidou, T., Tamura, J. and Imamura, M. (1994). Plasma membrane fluidity during regeneration and atrophy of the rat livers following portal branch ligation. *Eur. Surg. Res.* 26: 221-229.
- 42.**Kilsdonk, C. P. E., Yancey, G. P., Stoudt, W. G., Bangerter, W. F., Johnson, J. W., Phillips, C. M. and Rothblat, H. G. (1995). Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem* 270: 17250-17256.

- 43.** Kosk-Kosicka, D. and Bzdega, T. (1988). Activation of the erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase by either self-association or interaction with calmodulin. *J Biol Chem* 263: 18184-18189.
- 44.** Lanzetta, P. A., Alvarez, L. J., Reinach P. S., and Candia O. A. (1979). An improved assay for nanomole amount of inorganic phosphate. *Anal Biochem* 100: 95-97.
- 45.** Lijnen, P. and Petrov, V. (1995). Cholesterol modulation of transmembrane cation transport systems in human erythrocytes. *Biochem Mol Med* 56: 52-62.
- 46.** Lin, S-H., Wallace M. A., and Fain, J. N. (1983). Regulation of  $\text{Ca}^{+2}$ - $\text{Mg}^{+2}$  -ATPase activity in hepatocyte plasma membrane vasopressin and phenylephrine. *Endocrinology* 113: 2268-2275
- 47.** Lotersztajn, S., Pavoine, C., Brecheler, V., Roche, B., Dufour, M., Le-Nguyen, D., Bataille, D. and Pecker, F (1990). Glucagon-(19-29) exerts a biphasic action on the liver plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump which is mediated by G proteins. *J Biol Chem* 265: 9876-9880.
- 48.** Lotersztajn, S., Epand, R., Mallat, A and Pecker, F (1981). Inhibition by glucagon of the calcium pump in liver plasma membrane. *J Biol Chem* 259: 8195-8201.
- 49.** Lotersztajn, S., Pavoine, C., Deterre, P., Capeau, J., Mallat, A., Le-Nguyen, D., Dufour, M., Rouot, B., Bataille, D. and Pecker, F. (1992). Role of protein  $\beta$  subunits in the regulation of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump. *J Biol Chem* 267: 2375-2379.

**50.** Lotersztajn, S., Pavoine, C., Mallat, A., Stengel, D., Insel, PA, and Pecker F (1987). Cholera toxin blocks glucagon-mediated inhibition of the liver plasma membrane (Ca<sup>2+</sup> - Mg<sup>2+</sup>)-ATPase. *J Biol Chem* 262: 3114-3117.

**51.** Luciana, R., Mazzitelli and Adamo P. H. (2007). The phosphatase activity of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump. Activation by acidic lipids in the absence of Ca<sup>2+</sup> increases the apparent affinity for Mg<sup>2+</sup>. *Biochim Biophys Acta* 1768: 1777-1783.

**52.** MacLennan, D. H. (1970). Purification and properties of an adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 245: 4508-4513.

**53.** Mahammad, S. and Parmryd, I. (2008). Cholesterol homeostasis in T cells. Methyl-β-cyclodextrin treatment results in equal loss of cholesterol from Triton X-100 soluble and insoluble fractions. *Biochim Biophys Acta* 1778: 1251-1258.

**54.** McKenzie, R. C., Lotersztajn, S., Pavoine, C., Pecker, F., Eppard, R. M., and Orłowski R. C. (1990). Inhibition of the calcium pump by human parathyroid hormone-(1-34) and human calcitonin in liver plasma membrane. *J Biochem* 266: 817-822.

**55.** Mas-Oliva, J. and Delgado-Coello B. (2007). Protein Stability and the evolution of the cell membrane. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 146: 207-213.

- 56.** Mas-Oliva, J. (1985). Synthesis of ATP catalyzed by the  $(Ca^{+2}-Mg^{+2})$ -ATPase from erythrocyte ghosts. Energy conservation in plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 812: 163-167.
- 57.** Mas-Oliva, J. and Varela, E. M. (1987) Independent conformational changes caused by calmodulin and calcium in the cardiac microsomal  $(Ca^{2+},Mg^{2+})$ -ATPase during its ATP hydrolysis-ATP synthesis cycle. *J. Mol Cell Cardiol* 19: 39-46.
- 58.** Mas-Oliva, J. and Santiago- García , J. (1990) Cholesterol effect on thermostability of the  $(Ca^{+2} -Mg^{+2} )$ -ATPase from cardiac muscle sarcolemma. *Biochemistry International* 2: 233-241.
- 59.** Mas-Oliva, J., Pérez-Montfort R., Cárdenas-García, M. and Rivas-Duro, M. (1991). Altered coupling states between calcium transport and  $(Ca^{2+}, Mg^{2+})$ -ATPase in the AS-30D Ascites hepatocarcinoma plasma membrane. *Mol Cell Biochem* 100: 39-50.
- 60.** Mas-Oliva, J. (1992). Effect of calmodulin on sarcoplasmic reticulum  $Ca^{+2}$ -ATPase isolated from cardiac muscle *Cardioscience* 3: 107-115.
- 61.** Mattingly, R.R., Wasilenko J. W., Woodring, J. P. and Garrison C. J. (1992). Selective amplification of endothelium-stimulated Inositol 1, 4, 5- triphosphate and calcium signaling by v-src transformation of rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem* 267: 7470-7477.

- 62.** Mitra K., Belandia-Ubarretxena, I., Taguchi, T., Warren, G., and Engelman M. D. (2003). Modulation of the bilayer thickness of exocytic pathway membranes by membrane proteins rather than cholesterol. *Proc Natl Acad Sci* 101: 4083-4088.
- 63.** Munro, S. (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* 115: 377-388.
- 64.** Muriel, P. and Mourelle, M. (1990). The role of membrane composition in ATPase activities of cirrhotic rat liver: effect of silymarin. *Journal of Applied Toxicology* 10: 281-284.
- 65.** Nagata, J., Guerra, M.T., Shugrue, C.A., Gomes, D.A., and Nathanson, M.H.: Lipid rafts establish calcium waves in hepatocytes. *Gastroenterology* 133: 256-267, 2007.
- 66.** Mggli, V., Adunyah, E. S., and Carafoli, E. (1981). Acidic phospholipids, unsaturated fatty acids, and limited proteolysis mimic the effect of calmodulin on the purified erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPase *J Biol Chem* 256: 8588-8592.
- 67.** Ortega, A. and Mas-Oliva J. (1984). Cholesterol effect on enzyme activity of the sarcolemmal ( $\text{Ca}^{+2}$  - $\text{Mg}^{+2}$ )-ATPase from cardiac muscle. *Biochim Biophys Acta* 773: 231-236.
- 68.** Ortega, A. and Mas-Oliva, J. (1986). Direct regulatory effect of cholesterol on the calmodulin stimulated calcium pump of cardiac sarcolemma. *Biochem Biophys Res Commun* 139: (3) 868-874.

- 69.**Ortega, A., Santiago-García, J., Mas-Oliva J., and Lepock R. J. (1996) Cholesterol increases the thermal stability of the  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  - ATPase of cardiac microsomes. *Biochim Biophys Acta* 1283: 45-50.
- 70.**Pang, Y., Hua, Z., Ping W., Jianwen C. (2005). The characterization of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ - ATPase in rich sphingomyelin-cholesterol domains. *FEBS Lett.* 579: 2397-2403.
- 71.**Pedersen, P.L. and Carfoli, E. (1987). Ion motive ATPases I: ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends Biochem Sci* 12: 186-189.
- 72.**Post, R. L. and Sen, A. K. (1967). Sodium and Potassium stimulatedATPase. *Methods Enzymol* 10: 762-768.
- 73.**Prpic, V., Green, K. C., Blackmore, P. F. and Exton, J. H. (1984). Vasopressin-, angiotensin II-, and alpha 1-adrenergic-induced inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  transport by rat liver plasma membrane vesicles. *J Biol Chem* 259:1382-1385.
- 74.**Ramesh, C. G. (2007). *Veterinary Toxicology Basic and Clinical Principles*. Ed. ELSEVIER. New York. pp. 145-149.
- 75.**Rega, A. F., and Garrahan, J. P. (1975). Calcium ion-dependent phosphorylation of human erythrocyte membranes *J Membrane Biol* 22: 313-327.

- 76.** Reik, L., Petzold, G. L., Higgins J. A., Greengard, P., and Barnett R. J. (1970). Hormone-sensitive adenylyl cyclase: cytochemical localization in rat liver. *Science* 168: 382-384.
- 77.** Santiago-García, J., Delgado-Coello, B. and Mas-Oliva, J. (2000). Thermal analysis of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. *Mol Cell Biochem* 209: 105-112.
- 78.** Sepulveda, R. M., Carrillo-Berrocal M., Gasset, M. and Mata, M. A. (2006). The plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase isoform 4 is localized in lipid rafts of cerebellum synaptic plasma membranes. *J Biol Chem* 281: (1) 447- 453.
- 79.** Schatzmann, H. J. (1966). ATP-dependent  $\text{Ca}^{++}$  extrusion from human red cells. *Experientia* 22: 364-365.
- 80.** Schnitzer, J.E., On, P., Jacobson, B.S. and Dvorak, A.M. (1995). Caveolae from luminal plasmalemma of rat lung endothelium: microdomains enriched in caveolin,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, and inositol trisphosphate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 1759– 1763.
- 81.** Shinitzky, M. (1978). An efficient method for modulation of cholesterol level in cell membranes. *FEBS Lett.* 85: 317- 320.
- 82.** Smallwood J. I., Guegi, B., and Rasmussen, H. (1988). Regulation of erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}$  pumps activity by protein kinase C. *J Biol Chem* 263: 2195-2202.

**83.** Sonnino, S., and Prinetti, A. (2009). Sphingolipids and membrane environments for caveolin. *FEBS Lett.* 583: 597-606.

**84.** Stauffer, T., Hilfiker, H., Carafoli, E., and Strehler, E. (1993). Quantitative analysis of alternative splicing options for human plasma membrane calcium pump genes. *J. Biol. Chem.* 268: 25993-26003.

**85.** Toyoshima, H., Nakasako, M., Nomura, H. and Ogawa, H. (2000). Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405: 647-654.

**86.** Tang, D., Dean L. W., Borchman, D. and Paterson C. (2006). The influence of membrane lipid structure on plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity. *J Cell Calcium* 39: 209-216.

**87.** Taverna, R. D., and Hanahan, D. H. (1980). Modulation of human erythrocyte  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  ATPase activity by phospholipase  $\text{A}_2$  and proteases. A comparison with calmodulin *Biochem Biophys Res Commun* 94: 652-659.

**88.** Tresset, G. (2009). The multiple faces of self-assembled lipidic systems. *PMC Biophys* 2:

**89.** Van der Groot, F. G. and Harder T. (2001). Raft membrane domains: from a liquid-ordered membrane phase to a site of pathogen attack. *Semin Immunol* 13: 89-97.

- 90.** Vazquez-Prado, J., Medina, L., and García-Sáinz A. (1997). Activation of endothelin ET<sub>A</sub> receptors induces phosphorylation of  $\alpha_{1b}$ -adrenoreceptors in rat-1 fibroblasts. *J Biol Chem* 272: 27330-27337.
- 91.** Wang H., Haas, M., Liang, M., Cai, T. and Tian, J. (2004). Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *J Biol Chem* 279: 17250-17259.
- 92.** Wang K. K. W, Wright. L. C, Machan C. L., Allen B. C., Conigrave A. D. and Roufogalis B. D. (1991). Protein kinase C phosphorylates the carboxyl terminus of the plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase from human erythrocytes. *J Biol chem* 266: 9078-9085.
- 93.** Yeagle, P. L. (1983). Cholesterol modulation of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)–ATPase ATP hydrolyzing activity in the human erythrocyte. *Biochim Biophys Acta* 727: 39-44.
- 94.** Yeagle, P. L., Young, J. and Rice, D. (1988). Effects of cholesterol on (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase ATP hydrolyzing activity in bovine kidney. *Biochemistry* 27: 6449-6452.
- 95.** Yancey, G. P., Rodriguez V. W., Kilsdonk C. P., Stoudt, W. S., Jonson J. W., Phillips C. M., and Rothblat H. G. (1996). Cellular cholesterol efflux mediated by cyclodextrins. *J Biol Chem* 271: 16026-16034.

**96.** Zurini, M., Krebs, J., Penniston, J. T., Carafoli, E. (1984) Controlled proteolysis of the purified  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase of the erythrocyte membrane. A correlation between the structure and the function of the enzyme. *J Biol Chem* 259: 618-627.