

## Estudio subcelular de la acción del etanol en el miocardio\*

R. Castro\*\*, M. I. Rudolph, L. Bardisa y E. Ulloa

Departamento de Farmacología  
Instituto de Ciencias Médico-Biológicas  
Universidad de Concepción  
Concepción (Chile)

(Recibido el 20 de octubre de 1980)

R. CASTRO, M. I. RUDOLPH, L. BARDISA and E. ULLOA. *Subcellular Study of Ethanol Action on Myocardium*. Rev. esp. Fisiol., 37, 341-348. 1981.

The effect of ethanol on calcium binding activity in plasma membrane from dog cardiac muscle is described.

The binding activity to sarcolemma was measured by the centrifugation method. The ethanol effect on the activity was studied by measuring the amount of bound calcium when the preparation was incubated in an ethanol containing solution at a desired concentration.

Results showed that membrane bound calcium increased with ethanol concentration of up to 180 mM. Higher concentrations only decreased the amount of bound calcium.

En ensayos anteriores con preparación de aurícula aislada se ha comprobado un efecto depresor sobre la contracción cardíaca (2) y una acción que ha sido denominada «efecto de lavado de alcohol» (1, 4, 20, 23), la cual consiste en un aumento transitorio de la fuerza de contracción al retirar el etanol y el ion calcio del medio que baña la preparación, fenómeno que es posible explicar postulando

(1, 21, 22) que el etanol produciría una acumulación de calcio a nivel de los compartimentos subcelulares del músculo, y que al ser retirado de la solución amortiguadora de incubación este ion sería liberado, quedando disponible para participar en el proceso de contracción y produciendo, por consiguiente, un aumento en la tensión desarrollada.

Resultados previos obtenidos con  $Ca^{45}$  en preparación de Langendorff (22) y al cuantificar el calcio en tejido (1) sugieren que la interpretación planteada para el «efecto de lavado del alcohol» sería correcta.

Aunque no es posible indicar, en base a estos antecedentes, cuál es el compartimento donde se produce la acumulación

\* Trabajo financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Concepción a través del proyecto 2.09.27.

\*\* Dirección actual: Instituto de Higiene y Salud Pública, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, Valdivia (Chile).

de calcio, se puede postular que ocurre a nivel de membranas: plasmática, retículo sarcoplasmático o mitocondrias.

Con el propósito de comprobar la hipótesis planteada, se procedió en este trabajo a aislar la membrana plasmática del músculo cardíaco de perro y a estudiar el efecto del etanol sobre la actividad de unión de calcio. Se trabajó con dos preparaciones, cada una de las cuales se estudió por triplicado.

### Material y métodos

**Corazones.** Se han utilizado corazones de perros jóvenes de 4 a 6 kg de peso, del criadero del propio Instituto.

El método empleado para el aislamiento de la membrana plasmática es el descrito por FELDMAN y WEINHOLD (10, 11).

**Determinación de calcio unido.** Se midió incubando aproximadamente 0.60 mg de proteína de membrana en 1 ml de la mezcla de reacción  $\text{CaCl}_2$  0.1 mM, KCl 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM y Tris maleato 20 mM, con un pH final de 7.4.

La reacción se inició agregando la suspensión de membrana. Después de incubarse se continuó de acuerdo a la técnica de centrifugación (5, 7, 8, 19, 24, 25), descrita y utilizada ampliamente por otros autores.

El calcio se midió por espectrofotometría de absorción atómica en un aparato Perkin Elmer 305. Para evitar interferencias, las mediciones se realizaron a una concentración final de lantano de 10 mM (12).

**Determinación de proteínas.** Se empleó el método descrito por LOWRY *et al.* (17), con un estándar de albúmina humana.

**Reactivos.** El  $\text{CaCl}_2$ , maleato y ácido tricloro acético se obtuvieron de Merck y el Tris-HCl, Tris-Base e histidina se obtuvieron de Sigma.

### Resultados

Existen dos comportamientos de la membrana al ser incubada con etanol: a concentraciones bajas, aumenta la actividad de unión de calcio y, a concentraciones elevadas, se inhibe proporcionalmente a la cantidad de alcohol presente en el medio (fig. 1).

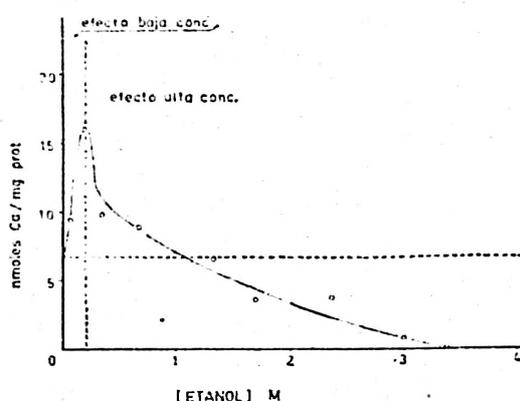


Fig. 1. Efecto del etanol sobre la unión de calcio a la membrana.

La línea segmentada horizontal corresponde al valor de calcio unido al incubar la preparación sin etanol. La línea vertical segmentada interpola la concentración que produce la máxima unión de calcio (180 mM). A la izquierda y derecha de la línea se aprecian los efectos de baja y alta concentración, respectivamente. Cada punto corresponde al promedio de seis determinaciones.

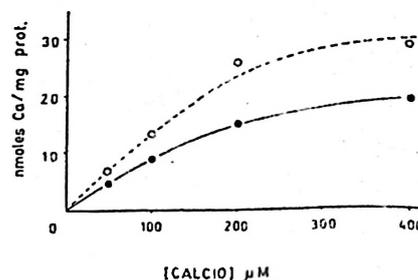


Fig. 2. Efecto del etanol 180 mM sobre la unión de calcio a la membrana. ○ = etanol 180 mM; ● = sin etanol. Cada punto corresponde al promedio de seis determinaciones.

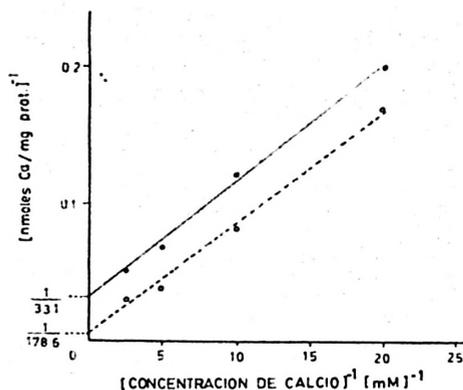


Fig. 3. Ploteo del inverso de la concentración de calcio en solución versus el inverso del calcio unido.

La intersección de las rectas con la ordenada corresponde al inverso de la unión máxima de calcio.  $\circ$  = etanol 180 mM;  $\bullet$  = sin etanol. Cada punto corresponde al promedio de seis determinaciones.

El máximo de unión ocurre a 180-190 mM de etanol. El efecto de esta concentración consiste en aumentar la cantidad de calcio unido, hasta un pico máximo; posteriormente se obtiene el efecto de alta concentración. La línea segmentada paralela a la abscisa corresponde al valor normal sin etanol en el medio de incubación.

El etanol 180 mM (fig. 2) aumenta la cantidad de calcio unido.

Del gráfico de los inversos (fig. 3) se obtiene que la constante de unión máxima aumenta de 33,1 a 178,6 nmoles Ca/mg proteína.

### Discusión

Por sus propiedades físicas el etanol puede actuar a nivel de todas las membranas de la miofibrila. El sarcolema se ha descrito (9, 16) como la fracción celular más importante para el desarrollo del proceso de la contracción, tanto cuantitativamente, por estar presente en cantidad superior a las otras, como cualitati-

vamente por constituir una barrera semipermeable que separa y conecta el medio interno del externo, el cual es de gran importancia en este tipo de músculo (5, 15).

A este nivel actuarían principalmente algunas drogas cardiotónicas, en especial aminas (10), metales (13, 14, 18) y además etanol, como se demuestra en el presente trabajo, ocasionando un aumento o inhibición de la unión de calcio a la membrana dependiendo de la concentración utilizada.

La unión de calcio a la membrana aumenta por efecto del etanol hasta una concentración de 180 mM, disminuyendo a concentraciones mayores (fig. 1). La preparación tratada con esta concentración de etanol presenta un aumento en la cantidad de calcio unido (fig. 2) y en la constante de unión máxima (fig. 3).

La acción dual del etanol sobre la membrana podría explicarse, a la luz de trabajos previos realizados por otros autores, como producto de su comportamiento en solución.

El alcohol, como asimismo otros anestésicos locales, produce la expansión de las membranas biológicas en una acción atribuida al espacio que ocupa la droga y a otra de tipo indirecto de ella (26).

La expansión es del orden del 3 % (26) con respecto a la superficie de la membrana en condiciones basales, magnitud que no permite atribuir plenamente a este fenómeno el aumento en la captación de calcio, aunque sí es probable que contribuya en cierto grado.

En cambio, la inclusión de las moléculas de alcohol dentro de la membrana produciría la expansión y alteración de ella, aumentando la fluidez y por ende los movimientos moleculares intraestructurales, incrementando en esta forma el número de grupos catiónicos dispuestos hacia el exterior y quedando, por lo tanto, en condiciones de mayor capacidad para unir calcio (y eventualmente otros cationes). Sin embargo, ante concentraciones elevadas, las moléculas de etanol

comenzarían por impedir que los citados grupos químicos presenten una adecuada disposición y distancia entre sí para realizar un enlace de tipo coordinado que existiría entre éstos y el ion de calcio (2, 26). Finalmente, la solubilización de los lípidos y coagulación de las proteínas impediría toda actividad (3, 17).

La concentración de etanol que produjera la máxima unión de calcio sería aquella que permitiera la mayor razón entre el efecto positivo de alteración estructural (efecto de baja concentración) y el de desnaturalización (efecto de alta concentración).

Mediante este comportamiento la membrana plasmática actuaría como un reservorio de calcio dependiente de etanol, participando en el fenómeno de «efecto de lavado del alcohol» en preparaciones de aurícula aislada y de Langendorff.

Sin embargo, sería necesario estudiar el comportamiento de la fracción mitocondrial y de retículo sarcoplasmático, posteriormente, para llegar a una conclusión sobre esta problemática.

#### Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. L. Balabanoff y a su equipo de trabajo la expedita asistencia prestada durante el desarrollo de la investigación. Así como a los Dres. C. Torres, L. Pavesi, Leticia Sánchez, F. Hernández, R. Zelman y M.<sup>a</sup> Angélica Mondaca el instrumental que facilitaron para este estudio.

Nuestro reconocimiento a D.<sup>a</sup> Pilar Riquelme por su cooperación en la redacción final del artículo.

#### Resumen

Se aísla la membrana plasmática del músculo cardíaco de perro y se describe el efecto producido por el etanol sobre la actividad de unión de calcio, elemento fundamental para el proceso de contracción.

La actividad de unión de calcio al sarcolema fue evaluada por el método de centrifugación. El efecto del etanol sobre esta actividad

se estudió midiendo el calcio unido al incubar la preparación en una mezcla de reacción conteniendo alcohol en la concentración deseada.

Se demuestra que la cantidad de calcio unido a la membrana plasmática aumenta por efecto del etanol hasta una concentración de 180 mM; por encima de este valor, disminuye.

#### Bibliografía

1. BARDISA, L., RUDOLPH, I. y CASTRO, R.: *Arch. Biol. Med. Exp.*, **12**, 479, 1979.
2. BARDISA, L., MONTOYA, G. y MERINO, A.: *Medicina*, **1**, 51-58, 1971.
3. BULL, H. y BREESE, K.: *Biopolymers*, **17**, 2121-2131, 1978.
4. CASTRO, R.: Tesis Doctoral. Escuela de Química y Farmacia y de Bioquímica, Universidad de Concepción (Chile), 1979.
5. EBASHI, S.: *J. Biochem.*, **50**, 236-244, 1961.
6. EBASHI, S. y ENDO, M.: *Progr. Biophys. Molec. Biol.*, **18**, 125-183, 1968.
7. EBASHI, S. y YAMANOSHII, I.: *J. Biochem.*, **55**, 504-509, 1964.
8. EBASHI, S. y LIPMAN, J.: *J. Cell. Biol.*, **14**, 389-400, 1962.
9. FABIATO, A. y FABIATO, F.: *Ann. Rev. Physiol.*, **41**, 473-484, 1979.
10. FELDMAN, A. y WEINHOLD, P.: *Biochemistry-USA*, **16**, 3470-3475, 1977.
11. FELDMAN, A. y WEINHOLD, P.: *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 2283-2289, 1977.
12. JANIS, R., LEE, E., ALAN, J. y DANIEL, E.: *Pflügers-Arch.*, **365**, 171-176, 1976.
13. KRASNOW, N. J.: *Molec. Cell. Cardiol.*, **10**, 55-66, 1978.
14. KU, D., AKERA, T., TOBIN, T. y BRODY, T.: *Naunyn-Schmied. Arch. Pharmacol.*, **290**, 113-131, 1975.
15. LANGER, G. y BRADY, A.: «The Mammalian Myocardium»; Willey, New Jersey, 1977.
16. LIMAS, C.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **179**, 302-309, 1977.
17. LOWRY, O., ROSEBROUGH, N., FAN, A. y RANDALL, R.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
18. MAYER, C., VAN BREEMAN, C. y R. CASTEEL: *Pflügers-Arch.*, **539**, 333-350, 1972.
19. OGAWA, Y.: *J. Biochem.*, **67**, 667-683, 1970.
20. RUDOLPH, I. y BARDISA, L.: *VI Congr. Latinoamer. Farmacol.*, Buenos Aires (Argentina), 1976.

21. RUDOLPH, I. y BARDISA, L.: *II Reunión Científica Regional Asoc. Latinoamer. Farmacol.* Viña del Mar (Chile), 1977.
22. RUDOLPH, I., BARDISA, L., CASTRO, R. y ULLOA, E.: *VII Congr. Latinoamer. Farmacol.* Sao Paulo (Brasil), 1978.
23. RUDOLPH, I., BARDISA, L. y CASTRO, R.: *Arzneimittel-Forschung* (en prensa).
24. SCARPA, A. y AZZI, A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 150, 473-481 1965.
25. SCHWARTZ, A.: *Fed. Proc.*, 35, 1279-1282, 1976.
26. SEEMAN, P.: *Pharm. Rev.*, 24, 583-655, 1972.
27. THOMAS, D., HOSSACK, J. y ROSE, A.: *Arch. Microbiol.*, 117, 239-245. 1978.

