



Proyecto n° PI-03-33-4798-2000

Homeostasis intracelular del calcio en células humanas y tripanosomatidios

Responsable: Benaim, Gustavo

Etapas cumplidas / Etapas totales 2/2

Especialidad: Biología celular

Resumen: Este proyecto tiene por objeto hacer un aporte a la regulación del Ca_{2+} en *Trypanosoma cruzi* y otros tripanosomatidios patógenos, para establecer las bases de una posible terapia combinada de drogas como posaconazol y amiodarona. En la primera etapa estudia el efecto de lípidos con grupos hidroxilo libres (ceramidas y diacilgliceroles) sobre la Ca_{2+} ATPasa de eritrocitos humanos y sobre el transporte de calcio asociado. El diacilglicerol produce un incremento marcado sobre la actividad de Ca_{2+} ATPasa de la membrana plasmática, y actúa de manera directa con la enzima purificada. La ceramida incrementa la actividad de la enzima purificada en cuanto a la hidrólisis de ATP y al transporte de Ca, mientras que la esfingosina muestra un efecto inhibitorio sobre la actividad de Ca_{2+} ATPasa. Para los tripanosomatidios no patógenos para el hombre, (*T. evansi*) sugiere la existencia de un depósito de Ca intracelular localizado en el RE, sensible a la tapsigargina, ya que ésta afecta la homeostasis intracelular de Ca. En la segunda etapa concluye que *T. cruzi* presenta un requerimiento esencial por ergosterol y el antifúngico posaconazol (inhibidor de la biosíntesis del ergosterol), tiene potente actividad tripanocida. Determina que la amiodarona es capaz de desestabilizar la homeóstasis de Ca_{2+} en el parásito, a la vez de bloquear la síntesis del ergosterol. Además logra determinar que el posaconazol afecta también la homeóstasis de Ca_{2+} , lo que explicaría el potente efecto sinérgico que se observa al administrar simultáneamente ambas drogas.

Productos

Publicaciones

Memorias

1. M. Winkler, C. Colina, O. LaRiva, MC. Pérez, V. Cervino, y G. Benaim, “Segundos mensajeros lipídicos como moduladores de la Ca_{2+} ATPasa de membrana de eritrocitos”, *Mem. Inst. Biol. Exp. (MIBE)*, **3**, 5-8, 2001.
2. V. Cervino, A. Rosales, y G. Benaim, “Estudio comparativo de la regulación del Ca_{2+} en los tripanosomatidios patógenos y no patógenos”, *Mem. Inst. Biol. Exp. (MIBE)*, **3**, 9-12, 2001.
3. M. Lugo y G. Benaim, “Métodos fluorescentes en el estudio de la regulación de la Ca_{2+} ATPasa de eritrocitos humanos”, *Mem. Inst. Biol. Exp. (MIBE)*, **3**, 13-16, 2001.

Artículos

1. C. Colina, V. Cervino, y G. Benaim, “Ceramide and sphingosine have an antagonistic effect on the plasma membrane Ca_{2+} ATPase from human erythrocytes”, *Biochem. J.*, **362**, 247-251, 2002.
2. R. Martínez, Y. Wang, G. Benaim, M. Benchimol, W. de Souza, D.A. Scott, y R. Decampo, “A proton pumping pyrophosphatase in the Golgi apparatus and plasma membrane vesicles of *Trypanosoma cruzi*”, *Mol. Biochem. Parasitol.*, **120**, 205-213, 2002.
3. V. Cervino y G. Benaim, “Efecto del etanol y del fosfatidiletanol sobre la Ca_{2+} ATPasa de la membrana plasmática *in situ*”, *Arch. Venezol. Farmacol. Terap.*, **21**, 83-90, 2002.
4. G. Benaim y A. Villalobo, “Phosphorylation of calmodulin: functional implications”, *Eur. J. Biochem.*, **269**, 3619-3631, 2002.



5. M. Mendoza, A. Mijares, H. Rojas, O. Colina, V. Cervino, R. DiPolo, y G. Benaim, "Evaluation of a thapsigargin sensitive calcium store in trypanosomatids using *Trypanosoma evansi* as a model", *J. Parasitol.*, **40**, 1181-1183, 2004.
6. G. Benaim, "La Ca_2+ ATPasa de la membrana plasmática como enzima clave en la homeostasis intracelular del calcio. Estimulación por etanol y otros efectores", (revisión), *Acta Cient. Venez.* (en prensa).
7. V. Salas, J. Sánchez-Tórriz, D.M. Cusido-Hita, Y. García-Marchán, F. Sojo, G. Benaim, y A. Villalobo, "Characterisation of tyrosinephosphorylation- defective calmodulin mutants", *Protein Express. Purif.*, (en prensa).
8. G. Benaim, J.M. Sanders, Y. García-Marchán, C. Colina, R. Lira, A.R. Caldera, G. Payares, C. Sanoja, J.M. Burgos, A. Leon-Rossell, J.L. Concepción, A.G. Schijma, M. Levin, E. Oldfield, y J.A. Urbina, "Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole", *J. Medicinal Chemistry*, **49**(3), 892-899, 2006.
9. C. Colina, A. Flores, C. Castillo, M.R. Garrido, A. Israel, R. DiPolo, y G. Benaim, "Ceramide-1-P induces Ca_2+ mobilization in Jukart T-cells by elevation of $Ins(1,4,5)-P_3$ and activation of store operated calcium channel", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **336**, 54-60, 2005.

Eventos

1. V. Cervino y G. Benaim, "Estudio comparativo de sistemas transportadores de calcio en *Crithidia fasciculata* y otros tripanosomatidios", *L Convención Anual de Asovac*, 2000.
2. Colina, V. Cervino, Y. Díaz, y G. Benaim, "Efecto diferencial de distintos esfingolípidos sobre la Ca_2+ ATPasa de la membrana plasmática de eritrocitos humanos", *L Convención Anual de Asovac*, 2000.
3. M. Lugo, M. Winkler, y G. Benaim, "Efectos del diacilglicerol sobre la fluorescencia intrínseca de la Ca_2+ ATPasa de la membrana plasmática", *L Convención Anual de Asovac*, 2000.
4. N. Oviedo, R. Marín, T. Proverbio, V. Cervino, G. Benaim, y F. Proverbio, "Actividad específica de la ATPasa de Ca_2+ purificada de glóbulos rojos provenientes de gestantes normotensas y pre-eclámpticas", *L Convención Anual de Asovac*, 2000.
5. G. Benaim, "Nuevos moduladores de Ca_2+ ATPasa de la membrana plasmática", *Simposio Investigaciones Recientes en Fisiología Celular y Biofísica*, *L Convención Anual de Asovac*, 2000.
6. G. Benaim, "Nuevos efectores de la Ca_2+ ATPasa vinculados a los mecanismos de transmisión de señales", *Simposio Farmacología Básica y Experimental*, *L Convención Anual de Asovac*, 2000.
7. V. Cervino, A. Rosales, y G. Benaim, "Regulación del calcio intracelular en tripanosomatidios patógenos y no patógenos", *LI Convención Anual de Asovac*, 2001.
8. C. Colina, V. Cervino, H. Rojas, M. Ramos, R. DiPolo, y G. Benaim, "Efecto de diferentes esfingolípidos sobre la concentración citoplasmática de Ca_2+ en células de Purkinje", *LI Convención Anual de Asovac*, 2001.
9. M. Winkler, M.C. Pérez, y G. Benaim, "Efecto del diacilglicerol sobre la Ca_2+ ATPasa de fantasmas de eritrocitos humanos", *LI Convención Anual de Asovac*, 2001.
10. Y. Salas, P.I. Palomo-Jiménez, G. Benaim, y A. Villalobo, "Fosforilación de la calmodulina por Src y por el receptor del factor de crecimiento epidérmico", *LI Convención Anual de Asovac*, 2001.



11. C. Colina, H. Rojas, M. Ramos, R. DiPolo, y G. Benaim, “Efecto del factor de crecimiento neuronal sobre la concentración citoplasmática de Ca^{2+} en células de Purkinje”, *LII Convención Anual de Asovac*, 2002.
12. M.C. Pérez, M. Winkler, y G. Benaim, “Estudio de diferentes drogas y efectores sobre la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática de eritrocitos humanos”, *LII Convención Anual de Asovac*, 2002.
13. Flores, C. Colina, C. Castillo, y G. Benaim, “La ceramida abre un canal de calcio capacitativo en linfocitos T Jurkat Purkinje”, *LIII Convención Anual de Asovac*, 2003.
14. C. Colina, M. Ramos, H. Rojas, R. DiPolo, y G. Benaim, “Estudio comparativo del efecto de distintos esfingolípidos sobre la homeostasis intracelular del Ca entre células de Purkinje y glias de cerebelo de rata”, *LIII Convención Anual de Asovac*, 2003.
15. M. Mendoza, A. Mijares, H. Rojas, C. Colina, Y. Cervino, R. DiPolo, y G. Benaim, “Homeostasis de Ca en *Trypanosoma evansi*: presencia de un depósito de Ca sensible a tapsigargina”, *LIII Convención Anual de Asovac*, 2003.
16. M.C. Pérez, M. Winkler, y G. Benaim, “Efecto de diferentes alcaloides sobre la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de eritrocitos humanos”, *LIII Convención Anual de Asovac*, 2003.
17. C. Colina, A. Flores, C. Castillo, R. DiPolo, y G. Benaim, “Efecto de la ceramida sobre la homeostasis intracelular del Ca^{2+} en linfocitos T Jurkat”, *LIII Convención Anual de Asovac*, 2003.
18. M.C. Pérez G., M. Winkler, y G. Benaim, “El diacilglicerol como modulador de la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa de eritrocitos humanos”, *LIII Convención Anual de Asovac*, 2003.
19. A. Flores, K. Acrich, J. Nuñez, C. Castillo, y G. Benaim, “La esfingosina incrementa la concentración intracelular del Ca^{2+} en células de feocromocitoma de rata (PC12)”, *LIV Convención Anual de Asovac*, 2004.
20. M.C. Pérez-G., A. Rosales, V. Cervino, y G. Benaim, “Caracterización de la Ca^{2+} -ATPasa de membrana plasmática de tripanosomatidios no patógenos”, *LIV Convención Anual de Asovac*, 2004.
21. C. Colina, A. Flores, A. Acosta, H. Rojas, C. Castillo, R. DiPolo, y G. Benaim, “La ceramida y la ceramida 1-P incrementan la concentración citoplasmática de Ca en linfocitos T Jurkat mediante la liberación de calcio desde reservorios intracelulares y la activación de canales de calcio”, *LIV Convención Anual de Asovac*, 2004.
22. V. Salas, J. Sánchez-Torres, Y. García-Marchán, G. Benaim, y A. Villalobo, “Producción, caracterización y fosforilación de mutantes de calmodulina deficientes en tirosina”, *LIV Convención Anual de Asovac*, 2004.
23. Y. García-Marchán, J.A. Urbina, y G. Benaim, “Efecto del ketoconazol sobre la regulación intracelular del calcio en *Trypanosoma cruzi*”, *LIV Convención Anual de Asovac*, 2004.
24. F. Sojo, V. Salas, J. Sánchez-Torres, A. Villalobo, y G. Benaim, “Efecto de diferentes mutantes de la calmodulina sobre la Ca^{2+} -ATP de la membrana plasmática de eritrocitos humanos”, *LIV Convención Anual de Asovac*, 2004.
25. G. Benaim, V. Cervino, M. Lugo, M. Winkler, G. LaRiva, y C. Colina, “La Ca-ATPasa de la membrana plasmática como enzima clave en la homeostasis intracelular del calcio, estimulación por etanol y otros efectores naturales”, *XXIII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular*. Granada, España., 2000.



26. M. Lugo, M. Winkler, C. Colina, Y. Cervino, V. Salas, G. LaRiva, y G. Benaim, G. “El diacilglicerol un novedoso modulador de la Ca-ATPasa de la membrana plasmática”, *IV Congreso Iberoamericano de Biofísica*, Alicante, España, 2000.
27. N. Oviedo, R. Marín, T. Proverbio, V. Cervino, G. Benaim, y F. Proverbio, “Estudio de la ATPasa de Ca₂₊ de eritrocitos de gestantes normotensas y pre-eclámpticas”, *XVII Reunión de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH)*, Curitiba, Brasil, 2001.
28. G. Benaim, M. Winkler, C. Colina, M. Lugo, V. Cervino, y G. LaRiva, “New modulators of the plasma membrane calcium pump”, *12th International Symposium “Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease”*, Cavalese, Trento, Italia, 2002.
29. V. Cervino y G. Benaim, “Intracellular calcium regulation in pathogenic and non pathogenic trypanosomatids”, *12th International Symposium Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease*, Cavalese, Trento, Italia, 2002.
30. V. Salas, J. Sánchez-Torres, D.M. Cusidó-Hita, Y. García-Marchán, G. Benaim, y A. Villalobo, “Production and characterization of tyrosine phosphorylation-defective calmodulin mutants”, *III Euroworkshop on Interdisciplinary Perspectives of Diagnostic Pathology, Cell Biology, and Morphometry (Biopath III)*, Madrid, España, 2002.
31. C. Colina, A. Flores, C. Castillo, R. DiPolo, y G. Benaim, “Ceramide increases cytoplasmic Ca concentration in Jurkat T cells by IP₃-induced calcium release and store-operated calcium”, *International Workshop Calcium Release and Cellular Calcium Signalling Domains*, Marbella, Chile, 2003.
32. G. Benaim, C. Colina, A. Flores, H. Rojas, A. Acosta, C. Castillo, y R. DiPolo, “Ceramide and ceramide-1-P increase cytoplasmic Ca concentration in Jurkat T cells by liberation of calcium from intracellular stores and activation of a store-operated calcium channel”, *International EMBO Workshop en Calcium Signaling an Disease*, Capri, Italia, 2004.
33. J.A. Urbina, G. Benaim, Y. García-Marchán, R. Lira, A.R. Caldera, G. Payares, C. Sanoja, y E. Oldfield, “Antiproliferative synergism of the antiarrhythmic compound amiodarone and posaconazole against *Trypanosoma cruzi*: in vitro and in vivo studies”, *44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Washington, DC, USA, 2004.
34. M.V. Salas, J. Escarate, J. Mejía, S.M. Pousa, G. Benaim, y L. Guevara, “Desarrollo e implementación de un método para la determinación de fosfato salival”, *XLI Congreso Odontológico Nacional*, Margarita, Venezuela, 2006.
35. A. Pimentel, I. Zambrano, J. Nieves, H. Rojas, F. Arvelo, y G. Benaim, “Caracterización del efecto de diferentes esfingolípidos sobre la movilización del Ca₂₊ intracelular en células de cáncer de mama humano”, *LVI Convención Anual de Asovac*, 2006.
36. M.C. Pérez-Gordones, V. Cervino, M. Suárez, M. Sayegh-Chediak, y G. Benaim, “Efecto del etanol sobre la forma truncada de la Ca₂₊-ATPasa de membrana plasmática PMCA4bA 118”, *LVI Convención Anual de Asovac*, 2006.
37. M. Suárez, H. Rojas, F. Arvelo, A., Suárez, R. Compagnone, y G. Benaim, “Efecto de las agelasinas, compuestos naturales con actividad citotóxica, sobre la línea celular de cáncer de mama mcf-7”, *LVI Convención Anual de Asovac*, 2006.
38. V. Salas, G. Benaim, y A. Villalobo, “Posible efecto estimulador de la calmodulina sobre la tirosina quinasa c-src”, *LVI Convención Anual de Asovac*, 2006.



39. H. Rojas, C. Colina, M. Ramos, G. Benaim, E. Jaffe, C. Caputo, y R. DiPolo, "La entrada de Na^+ acoplada al transporte de glutamato, activa al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en forma reversa promoviendo la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} en astrositos tipo-1 de cerebelo de rata", *LVI Convención Anual de Asovac*, 2006.
40. M. Sequera, A. Mahfoud, C. Domínguez, y G. Benaim, "Determinación de actividades enzimáticas de la cadena respiratoria mitocondrial: su aplicación en la construcción de una tabla de valores de referencia para el diagnóstico de enfermedades mitocondriales humanas en Venezuela", *LVI Convención Anual de Asovac*, 2006
41. Y. García-Marchán, I. Galindo, E. Rodríguez, C. Malave, N. Zerpa, F. Sojo, y G. Benaim, "Clonamiento y expresión de la calmodulina de *Trypanosoma cruzi*", *LVI Convención Anual de Asovac*, 2006.
42. I. Zambrano, J. Nieves C. Colina, F. Arvelo, y G. Benaim, "Efecto de diferentes esfingolípidos y compuestos citotóxicos naturales sobre la liberación de Ca^{2+} de reservorios intracelulares en cáncer de colon", *LVI Convención Anual de Asovac*, 2006.
43. G. Benaim, Y. García-Marchán, R. Lira, A. Caldera, G. Payares, C. Sanoja, E. Oldfield, y J.A. Urbina, "Antiproliferative synergism of the antiarrhythmic compound amiodarone and posaconazole against *Trypanosoma cruzi*: in vitro and in vivo studies", *Howard Hughes Medical Institute. 2005 Meeting of International Research Scholars*, Mérida, México, 2005.
44. A. Pimentel, C. Colina, A. Suárez, R. Compagnone, F. Arvelo, y G. Benaim, "Effect of sphingolipids and natural cytotoxic compounds on the intracellular calcium concentration on different cancer cells", *I International Congress of Therapeutics*, Caracas, Venezuela, 2005.
45. Y. García-Marchán, C. Colina, J.A. Urbina, y G. Benaim, "Effect of posaconazol and amiodarone on the intracellular calcium regulation in *Trypanosoma cruzi*", *I International Congress of Therapeutics*, Caracas, Venezuela, 2005.
46. G. Benaim, "Ceramide and ceramide-1-P increase cytoplasmic Ca^{2+} concentration in different cell lines by liberation of calcium from intracellular stores and activation of a store-operated calcium channel", *Gordon Research Conference on Glycolipid and Sphingolipid Biology*, Ventura, California, USA, 2006.
47. G. Benaim, C. Castillo, I. Zambrano, J. Nieves, F. Pasquali, A. Pimentel, A. Flores, F. Arvelo, M.R. Garrido, A. Stern, C. Colina, R. DiPolo, y H. Rojas, "Sphingolipids and calcium signaling", *Second Special Meeting of the International Society of Neurochemistry, on Neural Glycoproteins and Glycoproteins*, Antigua, West Indies, 2006.
48. C. Colina M. Ramos, H. Rojas, R. DiPolo, y G. Benaim, "Effect of different sphingolipids on the intracellular calcium concentration in Purkinje and glial cells", *Second Special Meeting of the International Society of Neurochemistry, on Neural Glycoproteins and Glycoproteins*, Antigua, West Indies, 2006.

Otros

Tesis de Doctorado

1. Moraima Winkler, "Interacción del etanol y otros efectores con la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática. Implicaciones sobre su regulación y mecanismo de acción", 2003.
2. Claudia Colina, "Efecto de los esfingolípidos sobre la homeostasis intracelular del Ca^{2+} en diferentes células de mamífero", 2004.
3. Miguel Lugo, "Estudios estructurales y cinéticos de la interacción de sustratos y efectores con el transportador multidrogas p-glicoproteína", 2007.



Tesis de Pregrado

1. María Carolina Pérez Gordones, “Estudio de diferentes efectores y drogas sobre la Ca^{2+} -ATPasa de la membrana plasmática de eritrocitos humanos”, 2003.
2. Karina Acrich, “Efecto de distintos esfingolípidos sobre la regulación intracelular del calcio en feocromocitoma adrenal de rata (PC12)”, 2004.
3. Miren Sequera, “Determinación de la actividad enzimática de los complejos de la cadena respiratoria mitocondrial su aplicación en el diagnóstico de enfermedades hereditarias mitocondriales”, 2004.
4. Felipe Sojo, “Efecto de mutaciones aminoácidas en la calmodulina sobre la Ca^{2+} -ATPasa de eritrocitos humanos”, 2005. *Taller*, “Elaboración de protocolos para el diagnóstico de leishmaniasis y su control de calidad”, Red Venezolana de Leishmaniasis, Centro de Convenciones, IDEA, Caracas, Venezuela, 2006.