

LA CONFORMACION MOLECULAR EN EL CONTROL BIOLOGICO

I

INTRODUCCION

FRANCISCO ALONSO DE FLORIDA¹

SI HEMOS de tener una visión a la vez analítica y unitaria de los procesos fisiológicos, es forzoso decir, una vez más, que la estructura y la función de los seres vivientes han de considerarse como categorías inseparables del fenómeno fisiológico.

Durante algún tiempo la Bioquímica se había desarrollado desconectada de esta idea de la investigación biológica. En el último decenio, sin embargo, la bioquímica ha caracterizado muchos fenómenos moleculares en las dimensiones de espacio y tiempo característicos de la función celular. Esta nueva actitud indagatoria ha permitido tender puentes, que era preciso establecer, entre la llamada fisiología de sistemas y el nivel molecular.

Los parámetros espacio-temporales han fecundado la Bioquímica. Los conceptos de organización funcional, información, control, integración y otros, constituyen ahora el eje de las investi-

gaciones más fructíferas de los mecanismos moleculares en las células. Por otra parte, muchos principios y conceptos de la Fisiología clásica, que se aceptaban en sus aspectos puramente operacionales, pueden concebirse ahora en su contexto físico.

Ahora bien, aquí se aborda una perspectiva de ese desarrollo interdisciplinario. Las macromoléculas se consideran como unidades de información del ser vivo. La interacción entre una molécula externa, o molécula ligante, con una macromolécula que forma parte de la entidad viviente, genera una señal, y ésta pone en marcha un fenómeno fisiológico. Desde que Lehninger habló por primera vez de mecanoenzimas, la atención se ha enfocado en los cambios de conformación que sufren las macromoléculas en general como consecuencia de la interacción con su molécula ligante. Por lo demás, como se tratará de aclarar en la discusión de los participantes, las macromoléculas de información presentan estereoespecificidad con respecto a la molécula ligante.

¹ Académico numerario, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

LA INTERACCION MACROMOLECULAR

FÉLIX CÓRDOBA¹

EN VISTA de la importancia que se atribuye en la actualidad a la conformación de las macromoléculas y estructuras biológicas más complejas para explicar ciertas activaciones e inhibiciones enzimáticas, los efectos *in vivo* de los anticuerpos y antígenos, los cambios de permeabilidad de las membranas celulares y otros, parece necesario identificar al máximo tanto los elementos estructurales de las macromoléculas como la naturaleza fisicoquímica y estérica de dichas interacciones.

Los detalles estructurales y energéticos de dichas modificaciones conformacionales se centran en residuos y radicales capaces de generar enlaces de fuerza débil de los llamados no covalentes. Dos características identifican aparte estas uniones de las de tipo covalente. En primer lugar la multiplicación de los enlaces es debida al tamaño de las moléculas y en segundo destaca la relativa debilidad de cada unión a pesar de lo cual establecen uniones múltiples tan firmes como las covalentes comunes. Adicionalmente, salta a la vista una situación inherente también a

estos sistemas, es decir, la necesidad de que la interacción macromolecular se establezca a través de superficies atómicas relativamente extensas (en área) y mutuamente complementarias, facilitando la interacción de que hablamos.

Estas limitaciones físicas del sistema condicionan enlaces débiles de dos tipos generales: los de unión de hidrógeno y los apolares o hidrofóbicos. En la figura 1 se ilustran las principales clases de enlaces de hidrógeno que se presentan en las interacciones macromoleculares con efecto configuracional. También se ilustran en la misma figura dos tipos frecuentes de uniones hidrofóbicas que parecen ir ganando importancia conforme se estudian más estas interacciones. Es de hacer notar que los enlaces iónicos están incluidos en los de hidrógeno, ya que no parece necesario diferenciarlos mejor en este caso.

El papel central que las ligaduras débiles tienen en la estructura macromolecular obedece a que los enlaces covalentes de las proteínas permiten a los átomos de la cadena peptídica adoptar un número astronómicamente grande de posiciones relativas entre sí, las cuales, debido a las interacciones no covalentes, son restringidas a una forma

¹ Académico numerario, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

única o cuando más a unas pocas. Es decir, una conformación macromolecular existe por uniones no covalentes múltiples particulares para cada una. El otro parámetro importante de la conformación es la distribución general de las cargas en la macromolécula. Aunque estas interacciones electrostáticas puedan estudiarse separadamente de los enlaces característicos son muy importantes en la interacción macromolecular.

Los procesos de cambio de conformación basados en uniones y rompimientos de las ligaduras mencionadas han generado teorías de termodinámica estadística. Una de las primeras de este tipo es la de Flory¹ que consideró el cambio de conformación como la transición de una forma cristalina a una forma amorfa (es decir, el paso de una estructura ordenada de α hélice, y otras, a una forma enrollada al azar). En esta teoría la energía estándar de desnaturalización se describió como sigue:

$$\Delta F^{\circ}_{\text{desn}} = \Delta F^{\circ}_b + \Delta F^{\circ}_x + \Delta F^{\circ}_{H\phi} + \Delta F^{\circ}_H + F^{\circ}_{\text{comb}} + \Delta F^{\circ}_{\text{elec}}, \dots$$

donde los términos del lado derecho tienen origen como sigue: ΔF°_b el cambio energético para desdoblar el centro helicoidal en ausencia de interacciones de cadenas laterales, ΔF°_x debido a enlaces entre las hélices en la fase cristalina, $\Delta F^{\circ}_{H\phi}$ y ΔF°_H como contribuciones de enlaces de hidrógeno e hidrofóbicos de cadenas laterales, $\Delta F^{\circ}_{\text{comb}}$, el cambio de energía para la combinación de la forma enrollada al azar con el solvente y $\Delta F^{\circ}_{\text{elec}}$, el cambio de la ener-

gía que se origina por la diferencia entre la energía libre electrostática entre las dos formas, ya que las dos formas están en mezcla se añade todavía un valor extra, el de la mezcla; $\Delta F^{\circ}_{\text{mezcla}}$. Los términos de los cambios de energía pueden calcularse matemáticamente de varias maneras tomando en cuenta interacciones de modelos relativamente sencillos.

En la teoría de Lifson y Roig,² más reciente, se estudian las transiciones de la hélice a formas desordenadas. Deliberadamente utilizan otros parámetros, considerando formas intermedias de transición, e incluyen la posibilidad de coexistencia entre formas helicoidales y al azar en cualquier lugar de la misma cadena, permitiendo cambios conformacionales limitados a porciones discretas de la molécula.

En este modelo los enlaces de hidrógeno entre los grupos NH y CO y las interacciones entre los grupos R de los aminoácidos tienden a estabilizar la estructura de α hélice, mientras que la energía libre originada por una libertad parcial de rotación interna y de la interacción del solvente y el polímero, favorece la formación de la estructura al azar. La energía total de conformación $V(n)$ se especifica en términos de los ángulos de rotación $\phi_1, \omega_1, \dots, \phi_n, \omega_n$ de los enlaces covalentes de las unidades peptídicas de la proteína.

Entrecruzamientos covalentes y lazos en las proteínas

La mayor parte de las uniones importantes en las alteraciones de conforma-

ENLACES NO COVALENTES

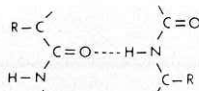
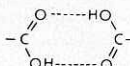
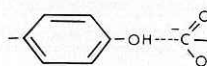
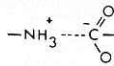
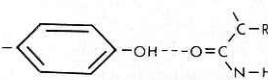
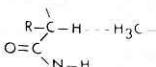
- a)  Enlace de hidrogeno entre grupos peptídicos
- b)  Enlace de hidrogeno entre grupos neutros
- c)  Enlace de hidrogeno entre un grupo cargado y uno neutro
- d)  Enlace de hidrogeno entre dos grupos cargados
- e)  Enlace de hidrogeno de cadena lateral y grupo peptídico
- f)  Enlace hidrofóbico entre grupos no polares
- g)  Enlace hidrofóbico entre cadena no polar y grupos de la estructura principal

Fig. 1. Enlaces no covalentes fundamentales en los cambios de conformación de los polipéptidos. El cambio de conformación se acompaña del rompimiento y reunión de algunos de estos enlaces en la proteína.

ción no son covalentes, pudiendo tratarse cuantitativamente de acuerdo con alguna de las teorías mencionadas y otras.³ Existen además varios tipos de enlaces covalentes de las cadenas laterales de los aminoácidos que unen ca-

denas peptídicas entre sí y contribuyen a la configuración total. Destacan entre ellos los grupos tiol de las cisteínas con un efecto en la transición de la estructura helicoidal a la amorfa, y los disulfuro que no se rompen durante la

fusión producida al separarse los enlaces no covalentes.

De acuerdo con las ideas de Flory,¹ se puede deducir que la estabilidad de la forma cristalina, y por tanto su punto de fusión, aumenta con los enlaces disulfuro. Estos enlaces tienden a reforzar las estructuras cristalinas a expensas de las amorfas.

La estructura del agua líquida

Las características del agua líquida indican que su estructura depende de uniones de hidrógeno en el seno del líquido. Nemethy y Scheraga⁶ y Frank y Wen⁷ proponen que cuando hay enlaces de hidrógeno existe una separación parcial de cargas entre las moléculas de agua adyacentes; esto promueve otros enlaces de hidrógeno con un efecto total cooperativo. Los enlaces se rompen y forman como consecuencia de las fluctuaciones locales de energía en el líquido. Los datos computados indican que 75% de las moléculas de agua, a 0°C, participan en la formación de agrupamientos, con un promedio de 91 moléculas de agua en cada uno. Ambos números descienden con la temperatura; a 70°C solamente 56% están en agrupamientos de 26 moléculas de agua cada uno.

Enlaces hidrofóbicos

Son las uniones entre grupos no polares sumergidos en agua. Aproximadamente 35 a 50% de los residuos de las proteínas tienen cadenas laterales no polares de alanina, leucina, y valina. Como estos grupos no polares pueden

interaccionar entre ellos y con el solvente solamente por fuerzas de Van del Waals, la contribución energética de los enlaces hidrofóbicos se atribuyó únicamente a esas fuerzas. Recientemente, sin embargo,⁴ se ha puesto en claro que la estructura del agua alrededor de los grupos es importante en la formación de los enlaces y en el cambio de energía libre del proceso.

Como la interacción de los grupos apolares y el agua no se favorece hay una tendencia termodinámica de los mismos grupos a unirse entre sí. El valor alto y positivo del cambio de la energía libre de solución aparece porque el exceso de entropía de la solución es negativo. Esto indica un cambio en la estructura del agua que se ha denominado formación de *icebergs* es decir, un ordenamiento del agua rodeando el soluto no polar acompañado de un aumento del número de uniones de hidrógeno. Un punto de vista algo distinto sobre los enlaces hidrofóbicos es el de Klotz y cols.,⁵ que consiste en imaginar el ordenamiento de las moléculas de agua como un enrejado cubriendo los grupos apolares e induciendo un efecto estabilizador de la estructura molecular.

Por otro lado, los cálculos en estos ejemplos dan un valor de 1.32 Kcal/mol para la energía necesaria para el rompimiento de una unión de hidrógeno. Para los enlaces hidrofóbicos se tomaron soluciones acuosas de hidrocarburos pequeños. A 25°C presentan $\Delta F^\circ_{\text{solucion}}$ de + 3 a + 8 Kcal/mol y un $\Delta H^\circ_{\text{solucion}}$ de 0 a 3 Kcal/mol. Estos valores varían un poco, dependiendo

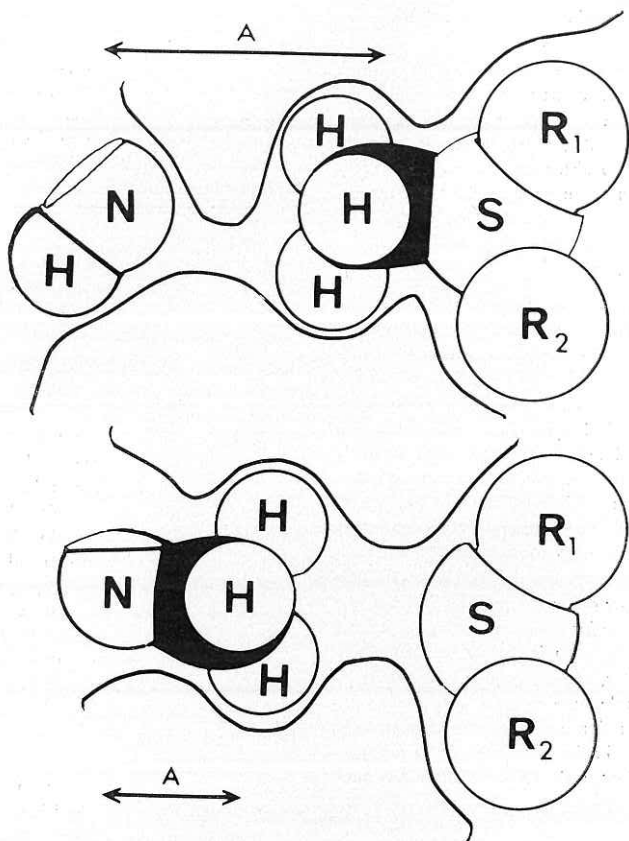


FIG. 2. Diagrama que muestra un "nicho" proteínico ideal para un nucleófilo y un ión sulfonio. Esta cavidad no será óptima en el caso del rompimiento de la sustancia ya que los enlaces se alargan y cambian los ángulos y la carga; se ha inducido una distorsión de la conformación de la proteína.

de la estructura del hidrocarburo. En el caso de proteínas la formación de enlace hidrofóbico cambia parcialmente

los signos de los valores ya que no toda la proteína se vuelve insoluble a la formación del enlace, aunque puede ocu-

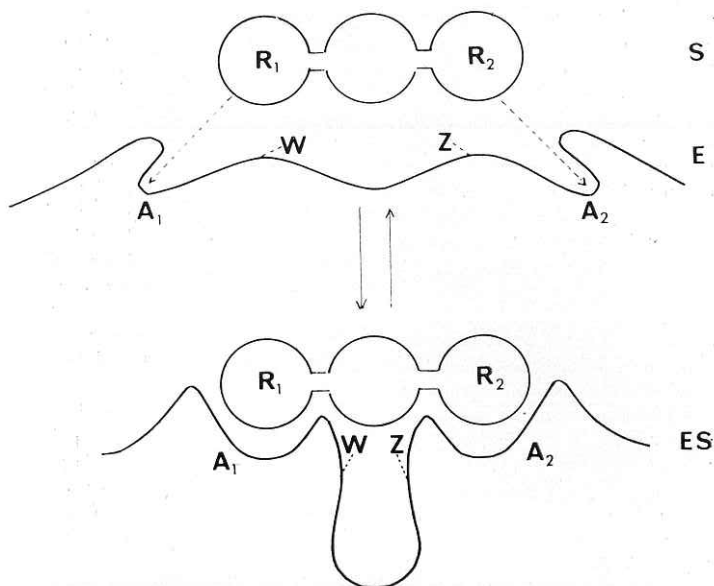


FIG. 3. El mecanismo del 'ajuste inducido' en las enzimas. En este caso la unión del sustrato en A_1 y A_2 modifica la conformación de modo que los grupos indispensables del sitio activo encuentran la posición relativa favorable para la catálisis. Ver grupos W y Z .

rrir en el interior de las proteínas globulares.

El cambio de la energía de formación del enlace hidrofóbico puede expresarse como sigue:

$$\Delta F_{H\phi}^{\circ} = \Delta F_W^{\circ} + \Delta F_S^{\circ}$$

donde W es la contribución energética debida al cambio de la estructura del agua de la capa limitante y S depende de los estados energéticos de las cadenas hidrofóbicas mismas.

Los factores citados arriba son algunos de los que participan en la forma-

ción de enlaces de conformación en las macromoléculas. Las uniones estabilizan, aunque sea transitoriamente, un cambio de conformación inducido por una interacción no covalente como las de antígeno y anticuerpo, iones y componentes particulares de las membranas y otras similares. Otros factores contribuyen también, en menor grado, en los procesos de conformación y en su oportunidad deben valorizarse. En fin, los enlaces no covalentes mantienen la conformación de la proteína y cualquier desorden o rompimiento, sin separación

conjunta de uniones covalentes, se conoce como desnaturalización. Una proteína se puede imaginar como compuesta de porciones helicoidales y porciones no helicoidales. Los cambios de conformación consisten en el paso de una estructura a la otra y a estructuras como de hoja plegada, alfa hélice invertida, etc., que se pueden representar como cambios de la forma general de la molécula, rápidos y reversibles (Figs. 2 y 3).

Es de suponer que la mayoría de los cambios de conformación biológicamente importantes no equivalen a modificaciones de la estructura a formas completamente amorfas. Los cambios conformacionales incompletos pueden tener repercusiones biológicamente dramáticas, por ejemplo, los efectos de la unión del antígeno y el anticuerpo y las actividades enzimáticas (Fig. 4). Las proteínas, además, dan una serie de reacciones fisicoquímicas las cuales, en un grado u otro, dependen a su vez de las interacciones no covalentes. Algunas de las principales interacciones secundarias son las siguientes:

a) Efectos estadísticos como los que tienen lugar en la ionización de un solo grupo tirosilo en una proteína con siete de estos grupos; la reactividad de los tirosilos subsecuentes será diferente a la del primero por efecto estadístico o cooperativo.

b) Efectos electrostáticos generalizados. Debido a que la proteína tiene una carga neta Z (promedio) habrá una atracción o repulsión entre la proteína cargada eléctricamente y el protón. Así, Lindstrøhm-Lang estudió el

problema destacando la importancia de los enlaces no covalentes en la ionización de grupos de la proteína.

c) Efectos locales electrostáticos. Las cargas eléctricas se distribuyen en forma dispareja y aparecen como agrupamientos cargados en varios sitios de la molécula. Nuevamente las curvas de titulación se afectan por los enlaces de hidrógeno de las cadenas laterales y por los enlaces hidrofóbicos. La modificación de la conformación se nota al aparecer "anormalidades" en las curvas de titulación de proteínas en comparación con las de los modelos apropiados.

d) Uniones de hidrógeno de las cadenas laterales. Al igual que en el caso anterior, los valores de pK de grupos característicos de la proteína son modificados de acuerdo con la riqueza en enlaces de hidrógeno del grupo titulado.

Asociaciones proteínicas

Las asociaciones proteínicas y polimerizaciones o interacciones de las macromoléculas comprenden principalmente enlaces de hidrógeno de las cadenas laterales. La energía libre de asociación se origina por la formación de uniones entre las moléculas. Como ambas moléculas pueden ionizarse, el grado de formación de enlaces de hidrógeno dependerá del pH. Así, por ejemplo, la polimerización del monómero de fibrina, de acuerdo con la teoría termodinámica, ocurre por un mecanismo que forma enlaces de hidrógeno entre 19 tirosilos y 19 histidilos en la otra molécula proteínica. Otro ejemplo de la participación de enlaces de hidrógeno intermolecula-

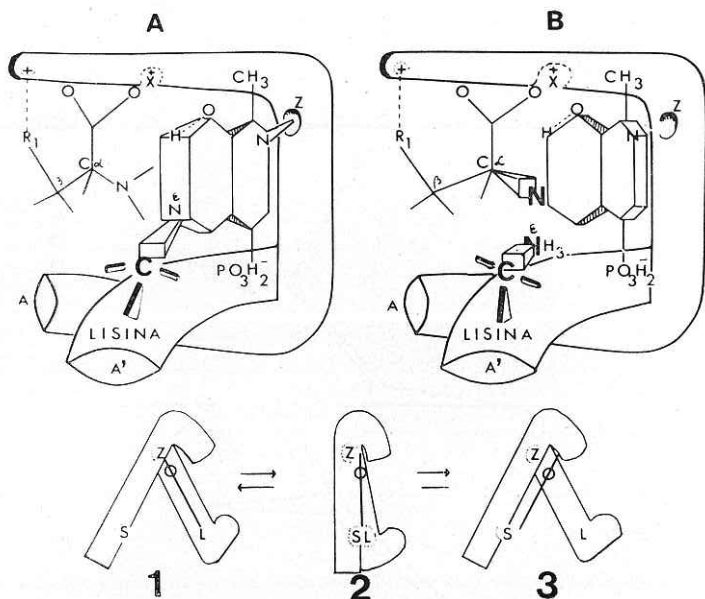


FIG. 4. La catálisis de formación y rompimiento de un enlace por acción de una enzima "oscilante". Nótese que la catálisis se basa en un cambio reversible muy rápido en la conformación enzimática (abajo). La enzima es la transaminasa aspártico-glutámico y la estructura central es el fosfato de piridoxal que también oscila de modo sincrónico (arriba).

res es la asociación de la deshidrogenasa glutámica. Las cadenas peptídicas de la enzima están unidas a través de ligaduras de hidrógeno entre tirosilos y carboxilatos y la ruptura de las ligaduras produce la disociación de la molécula.

Nomenclatura de los cambios conformacionales de los polipéptidos.

El segundo aspecto del problema que consideramos esencial en el estudio de los cambios conformacionales de las ma-

cromoléculas, específicamente de las proteínas, se refiere a una nomenclatura para describir de modo preciso las alteraciones que aparecen debido a la naturaleza de los medios en que se encuentran: pH, fuerza iónica, temperatura, organización vecina y a las interacciones con otras moléculas y sustancias de bajo peso molecular.

Es evidente que no basta postular ciertos efectos biológicos, ya sean actividades enzimáticas, fenómenos de membrana o modificaciones de los flujos

iónicos a través de intercapas, por cambios conformacionales inducidos en ciertas proteínas del sistema sino que es necesario definir la localización, giros, duración, reversibilidad y cambios energé-

ticos de las macromoléculas responsables del efecto. El hecho de que en los casos de estructuras muy complejas eso no sea posible, no justifica necesariamente desechar ese punto de vista. Cuando

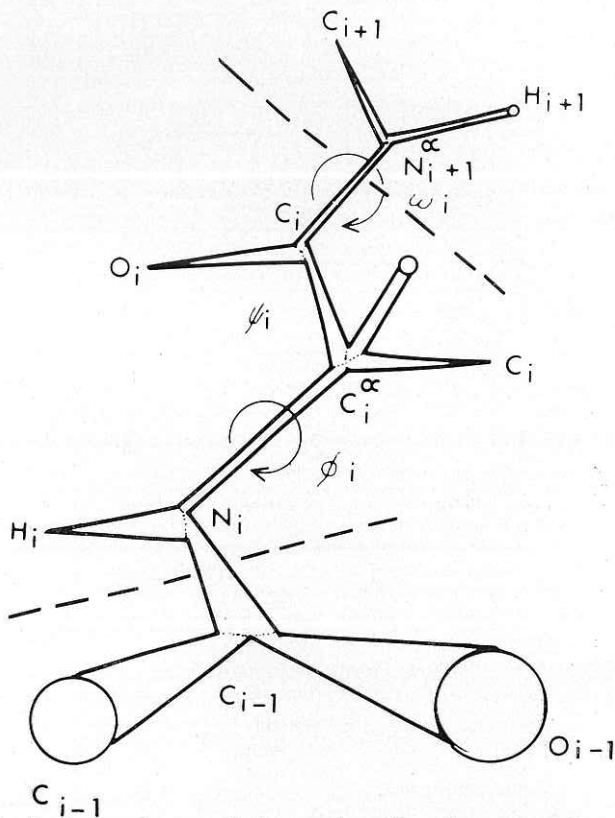


FIG. 5. Esquema de una sección de una cadena polipeptídica con dos de las unidades peptídicas. Los límites de un residuo se indican por líneas punteadas. Se ilustran los símbolos recomendados para los átomos de la estructura central y para las rotaciones de los enlaces. (Tomado de Edsall et al., ref. 8).

parezca factible será deseable profundizar las bases fisicoquímicas de las configuraciones moleculares alteradas durante el fenómeno biológico.

Por ahora se presentan algunos de los términos convencionales usados para describir sistemáticamente los cambios de conformación en el caso de polipéptidos.⁸ En la figura 5, se puede observar una sección de una cadena polipeptídica con dos unidades peptídicas. Los límites de un residuo están comprendidos por las líneas punteadas. Se observan los símbolos usados para designar a los átomos de un residuo $C_1 +$, C_1 , $C_1 -$, localizando los residuos anterior y posterior. También se discriminan las rotaciones de los enlaces covalentes. El enlace entre la unidad $i + 1$, y la unidad i , se denomina ω_i , del enlace N-C. El enlace C-C, de la unidad i , se denomina ψ_i , y el enlace C-N, también de la unidad i , se califica con la letra griega ϕ_i .

Las proposiciones de una nomenclatura estándar para describir las conformaciones de los polipéptidos son más completas; se toman en cuenta posiciones y giros de los átomos de las cadenas laterales de los aminoácidos y las conformaciones helicoidales, describiendo con "n" el número de residuos por vuelta, con "h" la unidad de altura del residuo y con "l" el ángulo de rotación alrededor del eje de la hélice donde

360

$t = \frac{360}{n}$. Se sugieren soluciones para describir también los enlaces de hidrógeno de los átomos de un residuo a otro residuo de la cadena, ya sea vecino o

alejado del primero en la estructura polipeptídica.

A pesar de la dificultad en la nomenclatura de los efectos conformacionales, salta a la vista su utilidad al computar los datos obtenidos, aunque éstos se refieran casi siempre a la parte central de la estructura de la proteína. Ramachandran⁹ construyó mapas conformacionales con los datos obtenidos al analizar polipéptidos de estructura conocida. Lo más ilustrativo de ese tratamiento a base de mapas son los contornos que representan los límites estéricamente posibles de los residuos donde, asignando distintos valores para las distancias de Van der Waals, se obtienen contornos del residuo "contraído" o "extendido"; en el primer caso con menos libertad de giro tanto alrededor del enlace ϕ como alrededor de la unión ψ . Se observa y mide el cambio de la conformación.

En resumen, se ha tratado de llamar la atención en que las alteraciones de la conformación de una macromolécula, residen, especialmente en el caso de las proteínas, en las propiedades de las uniones no covalentes de hidrógeno e hidrofóbicas, y en menor grado en los enlaces covalentes disulfuro, y que los cambios conformacionales pueden examinarse como un caso limitado de desnaturalización acompañados de una transición reversible de la estructura de hélice a formas amorfas. Los datos termodinámicos en estos estudios pueden manejarse de manera semejante a como lo han hecho los investigadores del fenómeno de la desnaturalización.

Parece conveniente insistir, finalmen-

te, que en los casos donde la información estructural sea suficiente, se describirá en términos de átomos, giros, enlaces, rotaciones, o ángulos, y el grado y extensión de los cambios conformacionales obtenidos. Esta información puede computarse en forma de mapas conformacionales, que ilustran objetivamente el fenómeno.

REFERENCIAS

1. Flory, P. J.: *Role of crystallization in polymers and proteins*. Science 124: 53, 1956.
2. Lifson, S. y Roig, A.: *On the theory of helix-coil transition in polypeptides*. J. Chem. Phys. 34: 1963, 1961.
3. Nagai, K.: *Dimensional change of polypeptide molecules in the helix-coil transition region*. II. J. Chem. Phys. 34: 887, 1961.
4. Kauzmann, W.: *Some factors in the interpretation of protein denaturation*. En: *Advances in Protein Chemistry*. Anfinsen, C. B.; Anson, M. L.; Bailey, K. y Edsall, J. T. (Eds.) New York, Academic Press. 1959. Vol. 14, p. 1.
5. Klotz, I. M. y Laborsky, S. W.: *The binding of organic ions by proteins. Effects of changes in solvent and their implications as to the nature of the complexes*. J. Am. Chem. Soc. 81: 5119, 1959.
- 6a. Nementhy, G. y Scheraga, H. A.: *Structure of water and hydrophobic binding in proteins. I. A model for the thermodynamic properties of liquid water*. J. Chem. Phys. 36: 3382, 1961.
- 6b. Idem: *II. Model for the thermodynamic properties of aqueous solutions of hydrocarbons*. J. Chem. Phys. 36: 3401, 1961.
7. Frank, H. S. y Wen, W. Y.: Discussion Faraday Soc. 24: 133, 1957. Citado en: Poland, D. y Scheraga, H. A.: *The helix-coil transition in heteropolymers*. En: *Theory of Helix-Coil Transitions in Biopolymers*. New York, Academic Press. 1970. p. 140.
8. Edsall, J. T.; Flory, P. J.; Kendrew, J. C.; Liguori, A. M.; Nemethy, G. y Ramachandran, G. N.: *A proposal of standard conventions and nomenclature for the description of polypeptide conformations*. J. Mol. Biol. 15: 399, 1966.
9. Ramachandran, G. N.; Ramakrishnan, L. y Sasisekharan, V.: *Stereochemistry of polypeptide chain configuration*. J. Mol. Biol. 7: 95, 1963.

III

EL FENOMENO COOPERATIVO EN LAS MEMBRANAS

ARMANDO GÓMEZ-PUYOU¹

EN ESTE trabajo se propone discutir la posibilidad de que en las membranas biológicas exista un fenómeno cooperativo semejante al que se ha demostrado en algunas macromoléculas. Sin embargo, se debe aclarar que muchos de los datos permiten sólo inferencias indirectas, debido al limitado conocimiento que tenemos sobre la estructura de las membranas. Se tratará el problema refiriéndolo a las características de las llamadas enzimas o proteínas alostéricas.

Las proteínas alostéricas contienen varios sitios donde se puede acoplar una molécula, ya sea de sustrato, de inhibidor, o de activador, de suerte que existe en la proteína una cadena polipeptídica para cada uno de los "ligandos" mencionados. La proteína alostérica más extensamente estudiada es la molécula de la hemoglobina, la cual tiene cuatro residuos o subunidades funcionales capaces de captar oxígeno. Tales subunidades polipeptídicas están compuestas por secuencias de aminoácidos idénticas entre sí.¹

La característica funcional más importante de las enzimas alostéricas es que, bajo condiciones apropiadas, la relación entre la velocidad de la reacción y la concentración del sustrato, inhibidor, o activador, no sigue la ecuación clásica de Michaelis, sino que la velocidad de reacción tiene un patrón característico, de modo que la curva que se obtiene experimentalmente es sigmoide, indicando que la entrada de una (o más) moléculas del sustrato de la proteína facilita la entrada de otras moléculas de sustrato. Por consiguiente, tanto la velocidad como el equilibrio de la reacción dependen del número de sitios que se encuentran acoplados al oxígeno. Los datos experimentales, en efecto, indican que la velocidad de unión del oxígeno a la hemoglobina aumenta, y la constante de disociación del complejo hemoglobina-oxígeno disminuye, a medida que el número de sitios ocupados por el oxígeno aumenta. Como los cuatro grupos heme están muy separados entre sí, se piensa que la unión del oxígeno al grupo heme afecta la configuración del complejo heme-polipéptido, y que este cambio conformacional, a su vez, modifica la

¹ Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

configuración de las tres cadenas polipeptídicas. El cambio conformacional inducido por el sustrato, es en definitiva, el responsable de los cambios en la afinidad y en la constante de disociación.

Una representación idealizada de lo que es una proteína alostérica se basa en los argumentos de Monod, Wyman y Changeux² (Fig. 1). La enzima con sus múltiples sitios activos, puede existir en dos estados conformacionales, según esté combinada o no. Puesto que todas las subunidades dentro del agregado común son idénticas, el cambio afecta a la totalidad de la molécula.

Los grupos que se ven afectados en su afinidad se llaman efectores. El papel del efector puede ser, como en los ejemplos citados, llevar el equilibrio hacia el estado activo de catálisis, y entonces se califican como activadores. En cambio aquellos que llevan a la proteína hacia el estado inactivo reciben el nombre de inhibidores. En ciertas enzi-

mas el mismo sustrato puede comportarse como activador.

Algunas moléculas que tienen muy poca relación estructural con el sustrato son, no obstante, capaces de alterar la velocidad de una reacción enzimática. Estas moléculas pueden actuar como inhibidores de la catálisis enzimática, mientras que otras pueden actuar como activadores. De todos modos, los efectores, por lo general, participan en la función de series metabólicas que, en su conjunto, aumentan o disminuyen la producción de determinado metabolito, adaptándose a las necesidades de la célula. Pero es conveniente señalar que los efectores pueden relacionarse con otras funciones como es la acción del ion potasio.³

Varios investigadores han sugerido en los últimos años que la membrana tiene un comportamiento análogo al de las enzimas que poseen varias cadenas polipeptídicas, en las cuales puede ocurrir

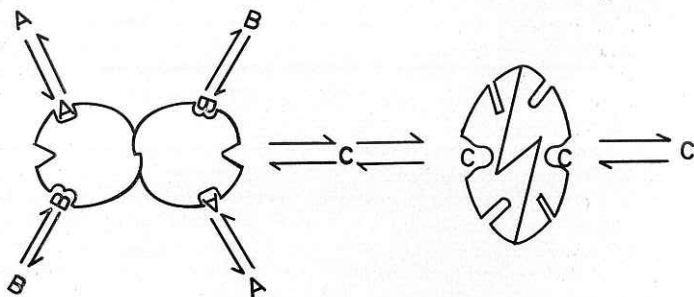


FIG. 1. Modelo de enzima alostérica. Las enzimas alostéricas, están formadas por cadenas polipeptídicas distintas y cada una de ellas ocupa una posición equivalente. A cada "ligando" le corresponde un sitio en cada protómero y la conformación de cada cadena polipeptídica está definida por su asociación con las otras cadenas. Las proteínas alostéricas existen cuando menos en dos estados y la afinidad hacia determinado "ligando" es distinta en uno u otro estado.

la alteración de la conformación de uno de sus protómetros o cadenas polipeptídicas.^{4 a 8}

Los datos de Tasaki y sus colaboradores^{6, 7, 8} son muy interesantes en este sentido. Estos investigadores lograron cambiar la composición interna del axón gigante del calamar y substituirlo por una solución salina de composición conocida. Por supuesto que la composición salina del medio externo se podía cambiar también. Los datos indicaron que la excitabilidad del axón se puede mantener por períodos largos, a condición de que se mantuviese un gradiente de iones a través de la membrana. Pero lo sorprendente de los experimentos de Tasaki es que la excitabilidad de la célula se conserva aún en la ausencia de Na^+ o K^+ en el interior de la membrana. Por consiguiente, Tasaki y su grupo concluyeron que sus datos no están de acuerdo con ninguna de las hipótesis que existían acerca del proceso de excitación de membranas. En su lugar propusieron que en el estado de reposo, la región externa de la membrana del axón contiene iones divalentes (probablemente Ca^{++}) que provienen del medio externo, y que cuando los nervios se estimulan por una corriente dirigida hacia el exterior, el ion divalente unido se intercambia por cualquier ion monovalente. Esta substitución de Ca^{++} por un ion monovalente origina un cambio en la conformación de algunas subunidades de la membrana y éste provoca un aumento de conductancia de la membrana. Al final del curso del potencial de acción, el ion monovalente se reemplaza, otra vez,

por el ion divalente (Ca^{++}) y la membrana vuelve a su conformación original. El mismo autor sugiere, además, que sólo una fracción relativamente pequeña del ion divalente es la que se intercambia por K^+ en condiciones normales. Dicho de otra manera, la alteración de pequeñas áreas de la membrana produce un aumento en la conductancia de una gran extensión de la misma membrana.

Es de interés notar que el intercambio de K^+ por Ca^{++} se observa también en las membranas mitocondriales, y que cuando esto ocurre se observan cambios característicos en las funciones mitocondriales.⁹

Otro hallazgo muy interesante desde el punto de vista del fenómeno cooperativo en las membranas es el de Moore y Narahashi¹⁰ sobre la tetrodotoxina, un veneno del pez *fugu* del Japón. Este compuesto tiene la propiedad de bloquear el potencial de acción en cantidades extremadamente pequeñas, pero sólo cuando se aplica a la superficie externa de la membrana del axón. La tetrodotoxina, de acuerdo con Moore y Narahashi, actúa inhibiendo, a semejanza de los experimentos de Tasaki y cols., el intercambio de cationes monovalentes por cationes divalentes.

Los datos de Moore y Narahashi son muy ilustrativos, desde el punto de vista del fenómeno cooperativo en membranas. Estos investigadores titularon los sitios de membranas sensibles a la tetrodotoxina y sus resultados indican que como máximo existen 13 sitios sensibles por micra cuadrada de membrana, lo cual es, sin embargo, suficiente para

bloquear totalmente el potencial de acción.

Parece, pues, que la estructura de la membrana es semejante a varios sistemas del estado sólido que los físicos exploran y a las proteínas alostéricas que los bioquímicos estudian. Los datos de Fortes¹¹ indican, además, que el tiempo de relajación de moléculas fluorescentes en la membrana del eritrocito es extremadamente largo, lo cual sugiere una gran inmovilidad de las moléculas que componen la membrana, análoga a ciertas restricciones que se imponen a los cristales.

Los efectos cooperativos de las membranas como las del axón o el eritrocito pueden observarse también en las membranas mitocondriales. La función de la membrana mitocondrial es la de formar ATP cuando los electrones pasan de un sustrato al oxígeno. En el paso de electrones del sustrato al oxígeno intervienen una serie de sistemas enzimáticos que aparentemente están en un contacto muy íntimo. Bajo condiciones normales el paso de electrones está ligado estrechamente a la formación de ATP. No existe respiración, a menos que pueda formarse ATP y *vice-versa*.

Ultimamente se ha logrado aclarar que no existe formación de ATP o respiración a menos que exista un catión monovalente (K^+ en condiciones normales).¹² Aún no se sabe cómo actúa el catión monovalente, pero se ha logrado observar que existe un intercambio de Ca^{++} por K^+ en las mitocondrias y que cuando esto ocurre se

presentan alteraciones funcionales características.⁹

De acuerdo con Tasaki y cols. el intercambio de K^+ por Ca^{++} desencadena el fenómeno de excitación en la membrana del axón, mientras que en las mitocondrias tal vez sea necesario para la formación de ATP.

Von Hippel y Wong¹³ demostraron hace algunos años que ciertos cationes alteran la estructura de las proteínas, y que esta capacidad de los cationes es distinta según la siguiente secuencia: $Li^+ < Na^+ < K^+ < Cs^+ < \text{tetrametilamonio}$. Además, el comportamiento de las proteínas con respecto a los cationes es universal: es decir, no importa qué tipo de proteína sea, los cationes siempre alteran su estructura siguiendo el ordenamiento mencionado.

De acuerdo con los datos de Von Hippel y Wong debería esperarse que si un catión alterara la estructura de una subunidad, y así desencadenara un fenómeno general, el efecto no fuera específico. Nosotros¹⁴ hemos visto que de hecho así ocurre en las mitocondrias, paralelamente a lo que Tasaki⁹ ha encontrado en las membranas del axón. También se podría esperar, de acuerdo con este argumento, que el orden con el cual los cationes alteran la estructura de proteínas siguiera el orden descrito en la alteración de macromoléculas. En la membrana del axón esto no se ha estudiado, pero en las mitocondrias¹⁴ el orden de efectividad encontrado es, en efecto, casi idéntico al observado por Von Hippel y Wong:¹³ $Li^+ < K^+ < Cs^+ < \text{tetrametilamonio}$.

Hemos observado asimismo en las

membranas mitocondriales que la respuesta respiratoria a concentraciones crecientes del catión, es del tipo sigmoide característico de las estructuras oligoméricas; es decir, de las proteínas formadas por varias subunidades. Pero

fenómeno cooperativo de las membranas.

Aparentemente, la organización y la función de las membranas sigue un patrón universal, que se adapta en cuestiones de detalle a las funciones espe-

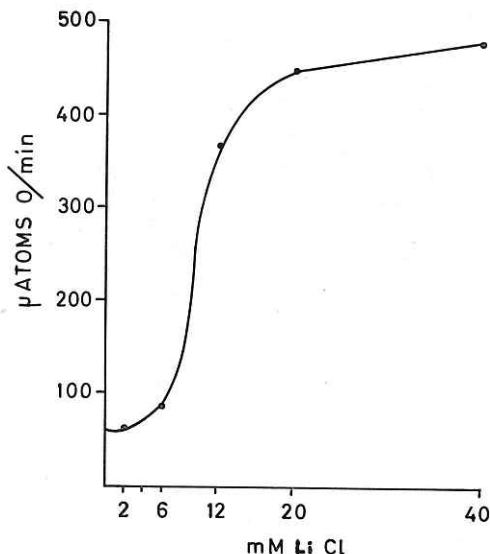


FIG. 2. Se representa la respiración mitocondrial en función de distintas concentraciones de LiCl. La respiración de mitocondrias con un contenido extremadamente bajo de K^+ (8 mM) se midió en distintos medios de incubación que contenían distintas concentraciones de LiCl. La respuesta es muy sugestiva de que el fenómeno cooperativo puede existir en las membranas mitocondriales.

además, la pendiente observada es de un orden mucho más alto que el de las enzimas alostéricas¹⁴ (Fig. 2), lo cual es de esperarse de acuerdo con el tratamiento matemático que Changeux y Thiery⁴ desarrollaron sobre el posible

cíficas de cada clase de membrana en particular. Los datos presentados indican que tanto en la membrana del axón, cuya función es el control de la excitabilidad del nervio y la propagación de los potenciales de acción, como

en las membranas mitocondriales, cuya función es controlar el gasto y formación del ATP, se observan indicaciones de un fenómeno cooperativo. Por consiguiente, es dable suponer que el fenómeno cooperativo no sólo existe en la mente de los investigadores es posible que también exista en las membranas.

REFERENCIAS

1. Perutz, M. F.: *Relation between structure and sequence of haemoglobin*. *Nature* 194: 914, 1962.
2. Monod, J.; Wyman, J., y Changeux, J. P.: *On the nature of allosteric transitions: A plausible model*. *J. Mol. Biol.* 12: 88, 1965.
3. Smulye, K. L. y Suelter, C. H.: *Univalent cations as allosteric activators of muscle adenosine 5'-phosphate deaminase*. *J. Biol. Chem.* 242: 1980, 1967.
4. Changeux, J. P. y Thiéry, J.: *On the excitability and cooperativity of biological membranes*. *Biochim. Biophys. Acta Library* 11: 116, 1968.
5. Lehninger, L. A.: *The neuronal membrane*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 60: 1069, 1968.
6. Tasaki, I.; Singer, I., y Takenaka, T.: *Effects of internal and external ionic environment on excitability of squid giant axons*. *J. Gen. Physiol.* 48: 1095, 1965.
7. Watanabe, A.; Tasaki, I., y Lerman, L.: *Bi-ionic potentials in squid giant axons internally perfused with sodium salts*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 58: 2246, 1967.
8. Tasaki, I.: *Nerve Excitation*. Springfield, Charles C. Thomas, 1968.
9. Lehninger, A. L.; Carafoli, E. y Rossi, C. S.: *Advances in enzymology*. 29: 259, 1967.
10. Moore, J. W. y Narahashi, T.: *Tetrodotoxin's highly selective blockage of an ionic channel*. *Fed. Proc.* 26: 1655, 1967.
11. Fortes, P. A. G. (Comunicación personal).
12. Gómez Puyou, A.; Sandoval, F.; Tuenaa, M.; Peña, A. y Chávez, E.: *Induction of respiratory control by K^+ in mitochondria*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 36: 316, 1969.
13. Von Hippel, P. H. y Wong, K.: *Neutral salts: The generality of their effects on the stability of macromolecular conformations*. *Science* 145: 577, 1964.
14. Gómez Puyou, A.; Sandoval, F.; Tuenaa, M. y Chávez, E.: *On the role of K^+ on oxidative phosphorylation*. *J. Biol. Chem.* 245: 5239, 1970.

IV

LA EXCITABILIDAD

FRANCISCO ALONSO DE FLORIDA^{1, 2} Y JESÚS G. NINOMIYA²

EN UN CAPÍTULO luminoso de la biología, Bichat¹ considera la vida como reacción y la expresa en este juicio general: "La vida es el conjunto de las funciones que resisten a la muerte". "Efectivamente —dice Bichat— la peculiaridad de la existencia de los cuerpos vivos consiste en que todo lo que los rodea tiende a destruirlos"... "el fenómeno... más general (de la vida) consiste en una alternancia habitual de acción por parte de los cuerpos exteriores y de reacción por parte del cuerpo vivo". La adecuación entre la acción y la reacción es un principio en el pensamiento de Bichat. Este aparece de nuevo con Sherrington quien analiza la integración refleja del sistema nervioso. Dice Sherrington:² "los movimientos (en el animal descerebrado) no son aleatorios, sino que tienen un claro significado, que se exterioriza como la simulación de algún acto que el animal normal realizaría en circunstancias análogas a las experimentales". El proceso es ciertamente específico y selectivo a los diversos niveles de inte-

gración del individuo; pero la reacción se caracteriza, además, por ser un proceso amplificador. Dice también Sherrington: "Un fantasma pudiera alcanzar apenas el umbral del poder físico de un estímulo, pero añadida la emoción puede convulsionar el animal entero". Asimismo añade: "Se ha demostrado que bajo circunstancias favorables la reacción de la retina a unos cuantos fotones puede ser percibida; y que la reacción puede desencadenar el comportamiento motor de todo el cuerpo". El proceso que se inicia en las dimensiones del *quantum*... "se eleva a las dimensiones molares".

Así pues, la *amplificación* y la *especificidad* se han reconocido desde los tiempos clásicos de la Fisiología como dos categorías fundamentales de la vida. Conviene, por consiguiente, en este coloquio, ya que pretendemos entender el control biológico al nivel molecular, y en particular los problemas de la excitabilidad, no perderlas de vista; sobre todo, si aceptamos que el diseño de la vida es redundante.

Desde un punto de vista biofísico, la reactividad biológica comienza por un proceso de *transducción*. En efecto, los

¹ Académico numerario.

² Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

sistemas vivientes son capaces de reconocer como señales a los incrementos o decrementos pequeños de ciertas modalidades de energía externa y de precipitar, como su consecuencia, un cambio en el propio sistema, cuyo curso temporal es independiente de la duración de la señal. Su integración depende de la particular disposición de sus partes, o sea de su organización funcional, y se realiza con un consumo, o liberación, de energía que no es provista por la señal, sino por la energía potencial almacenada en el mismo sistema, alimentado por su propia maquinaria metabólica. El cambio en el sistema se manifiesta, en última instancia, por el desarrollo de energía en una modalidad generalmente distinta de la señal, aunque en algunas ocasiones pueda ser igual.

La transducción a su vez, puede reducirse, en principio, a un problema de reconocimiento de formas moleculares, y así entra de lleno en el centro del presente coloquio. Examinemos, primero, la excitabilidad química. Los sistemas vivos individuales responden tan solo a ciertos compuestos externos, con exclusión de los demás; de suerte que a pesar de la considerable magnitud de las respuestas, las concentraciones efectivas en la fase acuosa externa se miden en microgramos, nanogramos o aún picogramos por mililitro. La masa total de la materia viva reactiva es enorme en comparación a la masa efectiva de la hormona, neurohormona o droga.

A fin de explicar la amplificación y la especificidad de las acciones químicas se ha postulado la existencia de *recepto-*

res situados en la membrana plasmática de las células. Estos fueron concebidos desde principios de siglo por Ehrlich³ como grupos químicos que en su conjunto forman una estructura tridimensional cuya topografía complementa la forma de la molécula del fármaco, como la llave complementa la forma de la cerradura. De igual manera, había interpretado Ehrlich la especificidad de los complejos anticuerpo-antígeno-complemento.

Ehrlich, sin embargo, pensaba que la molécula activa intervenía de algún modo, involucrando su propia materia (y su energía) en el proceso ulterior de respuesta, más concretamente, en los procesos enzimáticos de la célula, así afectada por una acción "tóxica". Es preciso, afirmaba, la fijación de la molécula para que ésta pueda actuar.

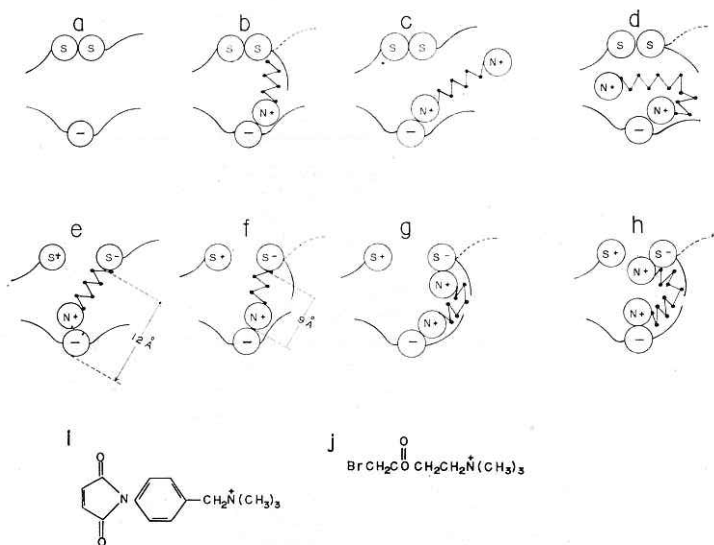
En el transcurso del tiempo las ideas de Ehrlich se han modificado en tres puntos muy importantes. En primer lugar, se entiende hoy en día en Farmacología y en Fisiología, que la "interacción" de la molécula del compuesto activo con su receptor específico genera un estímulo, el cual induce una secuencia de cambios dinámicos que constituyen la respuesta. La idea fue expuesta, por vez primera, por Croxato y Huidobro,⁴ de acuerdo con los cuales, el estímulo es la energía libre que resulta de un proceso análogo a la cristalización de la molécula activa dentro del receptor específico. En segundo lugar, el modelo de la llave y la cerradura ha sido reemplazado, tanto en la enzimología como en la farmacología. Siguiendo a Koshland⁵ y otros,⁶ se piensa

ahora que la correspondencia entre las moléculas bioactivas y los receptores no es exacta o precisa, sino más bien laxa. Por tanto, la interacción consiste esencialmente en un mutuo moldeado entre las dos moléculas participantes, que conducen a un cambio conformacional análogo al que sufren las enzimas al ajustarse en torno al sustrato.⁷ Es este cambio conformacional y el nuevo equilibrio energético que sigue a la interacción, los que dan lugar a la liberación de la energía libre, que constituye el estímulo que excita el sistema viviente. El concepto de que la activación (o la inhibición) se realiza mediante la contribución de la masa o la energía de la molécula externa al proceso metabólico de la célula, se ha abandonado para sustituirse por una noción primordial de la teoría del control de sistemas; precisamente la noción de *señal*. Por último, la actividad no se atribuye, ahora, a la fijación del compuesto a su receptor, como pensaba Ehrlich, sino a un cambio momentáneo inducido por la interacción molecular.⁸ El compuesto se asocia y disocia, según la ley de acción de masas, y la energía-señal es considerada como un fenómeno transitorio, consecuencia única de cada interacción, sin referencia primordial a la vida media del agregado, a no ser porque el recambio de la asociación-disociación determina la frecuencia de las interacciones.

Puesto que el acoplamiento entre el receptor y su ligante no es ajustado sino que más bien es flojo, la selectividad del receptor tampoco es absoluta.⁹ Es decir, un receptor determinado puede

interaccionar con familias enteras de compuestos emparentados en lo que se refiere a sus conformaciones. Esa familia de compuestos incluye algunos llamados *agonistas* por ser efectivos en inducir respuestas; otros, en cambio, los *antagonistas*, no inducen un estímulo, aunque sí se combinan con el receptor. Los antagonistas, por consiguiente, ocupan los receptores, de modo que administrados a las preparaciones biológicas interfieren con el efecto de los agonistas porque ocuyen por competencia a los receptores. Se encuentran, además, compuestos con actividad intermedia que actúan como *agonistas parciales*. Se asume, por consiguiente, que los agonistas parciales inducen un cambio conformacional de efectividad intermedia.

Muy ilustrativos desde ese punto de vista son los recientes experimentos de Karlin¹⁰ realizados en el *Electrophorus electricus* (Fig. 1). Los nervios que en esta especie inervan la electroplaca del órgano eléctrico, de modo análogo a los nervios motores del músculo, secretan acetilcolina en la sinapsis, y esta hormona determina la descarga eléctrica del órgano. La descarga es un arma defensiva del animal. Los receptores a que nos referimos son pues colinoceptivos. El receptor es seguramente una proteína que contiene un grupo disulfuro en su molécula que puede ser reducido y re-oxidarse *in situ*. Además, el receptor reducido puede unirse de modo covalente, es decir, por medio de enlaces químicos de alta energía a varias maleimidas, proceso que se conoce como alquilación. Se une asimismo con otros derivados. Se observa en-



tonces: *a*) que ciertos compuestos agonistas (la acetilcolina y otros compuestos monocuaternarios) normalmente efectivos, se tornan en inefectivos en el re-

ceptor reducido; *b*) que, por el contrario, ciertos compuestos normalmente antagonistas (v.g. hexametONIO), se comportan como agonistas en el recep-

tor reducido; *c*) que ciertos derivados que contienen amonio cuaternario en un extremo y que además reaccionan de modo covalente en el otro extremo con el sitio reducido del receptor, tienen la propiedad de que el amonio interacciona con el sitio activo e induce estímulos en la preparación; y *d*) que otros derivados de alquilación, cuya longitud molecular es mayor, son en cambio inefectivos.

Una posible interpretación de los resultados —dice Karlin— es que el sitio alquilado del receptor queda unido por un puente, que es la molécula en cuestión, con el sitio negativo del receptor y que la longitud del puente determina, bien una nueva conformación activa, ya una conformación inactiva. La distancia se ha estimado en 9 Å para la conformación activa y 12 Å o más para la inactiva.

La idea de la interacción-señal no es popular en la inmunología; ésta más bien se aferra a la vieja teoría de la fijación tóxica. Sin embargo, el grupo nuestro, en el laboratorio de Castillo^{11, 12} en San Juan, y en la Facultad de Medicina de México,^{13, 14} contiene que los fenómenos de hipersensibilidad son análogos a los de la acción humoral fisiológica. Los fenómenos líticos que a veces se observan, son probablemente debidos a una activación demasiado enérgica sobre el sistema que por decirlo así lo estropea, lo cual es un fenómeno bien conocido por los ingenieros de control y que no es extraño en la Fisiología.¹⁵

El cambio conformacional en la inmunología, está, por otra parte, bien documentado.^{16, 17} La molécula del an-

ticuerpo puede ser visualizada como una *Y* cuyas dos ramas superiores, o fragmentos *Fab* llevan las superficies de acoplamiento para el antígeno y la rama inferior es el fragmento *Fc*, el cual puede unirse de modo estereoespecífico a ciertos receptores en el tejido y también puede fijar el complemento. En efecto, Green y Valentin¹⁷ indagaron en el microscopio de electrones las figuras que se pueden formar *in vitro*, cuando se hacen combinar los anticuerpos dirigidos contra ciertos haptenos; es decir, grupos químicos sencillos que actúan como antígenos. El hapteno que utilizaron es un compuesto de unos 25 Å de longitud con sendos grupos difenilo en los extremos. Las figuras que se forman son polihedros muy variables con respecto al número de sus lados. Pero la figura más pequeña que en efecto se obtiene es justamente el triángulo (Fig. 2). Los triángulos seguramente resultan del enlace de tres yes mediante tres haptenos, de modo que en cada vértice sobresale el fragmento *Fc* como una protuberancia. Esto último se comprobó, puesto que la acción de la pepsina fue capaz de simplificar las figuras triangulares suprimiendo los lóbulos o protuberancias de los vértices. Se sabe, en efecto, que la pepsina hidroliza el fragmento *Fc* de la inmunoglobulina.

El significado funcional de esos hallazgos parece claro. Las dos ramas de la *ye* que es la molécula de inmunoglobulina, se encuentran normalmente cerradas formando un ángulo de 0°, pero pueden girar, como sobre una bisagra, en torno al fragmento *Fc*, no sin pro-

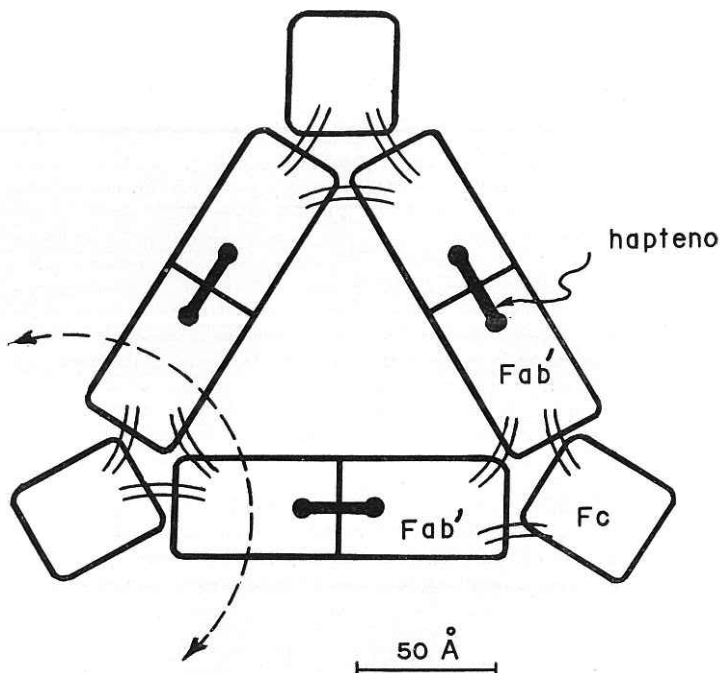


FIG. 2. Muestra tres moléculas de inmunoglobulina (anticuerpo) en forma de Y cuyos fragmentos *Fab'* están enlazados entre sí mediante un hapteno. Los fragmentos *Fc* sobresalen hacia afuera del triángulo formado. Los datos para hacer el esquema fueron obtenidos de las micrografías. Se piensa que las dos ramas *fab'* de la inmunoglobulina, normalmente cerradas, pueden girar en torno al fragmento *Fc* como en una bisagra y abrirse a modo de formar el triángulo, pero que el giro produce un cambio conformacional en *Fc*. Este último es seguramente responsable de los efectos biológicos. (Modificado de Valentine and Green¹⁷).

ducir un cambio conformacional importante en este último. La medida de los diversos polihedros demuestran que la apertura de las dos ramas puede ser considerable. Tal vez pudiera alcanzar hasta 180°. El cambio conformacional que sufre el fragmento *Fc*, pudiera

transmitirse de modo cooperativo a sus sitios de acoplamiento en el tejido y explicar así los fenómenos de la hipersensibilidad, incluida la secreción de hormonas locales^{18, 19} y la acción directa en el músculo.²⁰ Las corrientes actuales de pensamiento, sin embargo, tienen la

que propician un cambio funcional en el sistema. De ese modo es posible, por ejemplo, la formación de canales transversales en la membrana celular, a través de los cuales pueden circular corrientes iónicas conforme con los gradientes electroquímicos existentes a tra-

mezanismo del movimiento de iones es la función de los *acarreadores*.²⁶ Estos se han querido ver como moléculas estereoespecíficas capaces de formar agregados con algún ion determinado; monovalente como el sodio o el potasio, o bivalente como el calcio. Una vez for-

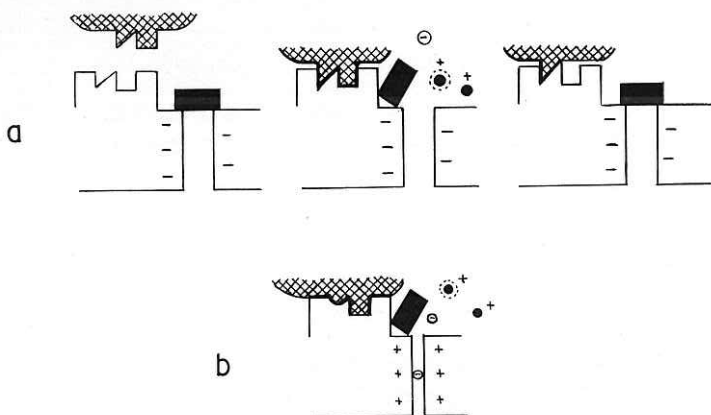


Fig. 4. En *a* se ilustra de una manera esquemática la acción de una unidad estereoespecífica (receptor o anticuerpo). A la izquierda se encuentra el sistema en reposo. Al centro se verifica una interacción efectiva, capaz de abrir una "válvula" y dejar así el paso franco a los iones a través de un canal. La interacción de la izquierda es inefectiva. Dependiendo del calibre y de la carga de las paredes del canal, así como de los gradientes electroquímicos (concentraciones y cargas de los iones) se seleccionan las clases de iones que penetren y los efectos ulteriores del movimiento iónico. Se ha supuesto en el esquema que el efecto en *a* (al centro) es excitatorio. Por el contrario el efecto en *b* es inhibitorio. Tales efectos de válvula seguramente se consiguen mediante mecanismos de propagación cooperativa.

vés de la membrana (Fig. 4). Tales corrientes se pueden convertir ulteriormente en la señal que precipita ciertos cambios intracelulares de igual modo cooperativos, y que conducen a la contracción o a la secreción.

Otra posibilidad alternativa para el

mado el agregado, éste se mueve desde una fase de la membrana hasta la otra, donde suelta al ion, y entonces, debido a la agitación térmica regresa a su origen. Sin embargo, una manera de entender el proceso más acorde con el fenómeno cooperativo pudiera ser la

siguiente (Fig. 5): supóngase una cadena de unidades estereoespecíficas situadas transversalmente en la membrana, desde la fase interna a la externa. La interacción de la primera unidad con el ion ligante tiene el efecto de cambiar la conformación de la segunda unidad, de modo que esta última se activa; es decir, la hace afín al ion particular de que se trate. Al mismo tiempo y de modo cooperativo se induce una reacción negativa en la primera unidad, de modo que ésta pierde su afinidad. Por consiguiente, el ion tiende, en un sentido probabilístico, a progresar, como a saltos, hacia el sitio de mayor afinidad. El proceso puede así, repetirse a lo largo de la cadena de protómeros.

La invasión de un cierto dominio de la membrana por el proceso secuencial cooperativo explica el fenómeno de amplificación, desde el punto de vista informacional; es decir, la propagación de la señal y la expansión del fenómeno. Ahora bien, nosotros hemos demostrado que la interacción del antígeno con el anticuerpo unido a la superficie celular (músculo esquelético denervado) induce en la membrana cambios en su conductancia, los cuales justamente demuestran el paso de iones a través de la membrana, bien a lo largo de canales transversales o tal vez por medio del acarreo cooperativo. Por otra parte, Del Castillo y su grupo^{27, 28} demostraron posteriormente que ciertas membranas artificiales de lípidos, muestran

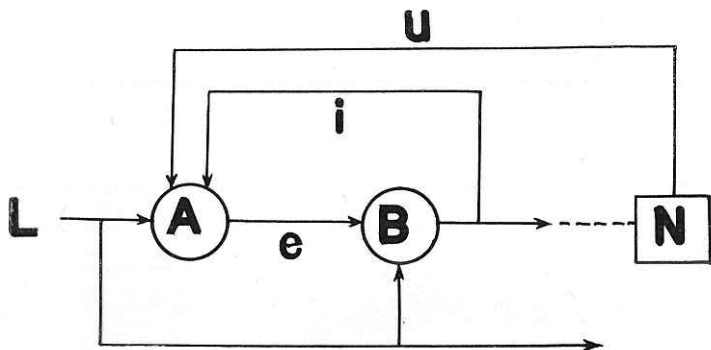


FIG. 5. Se ilustra un modelo de acciones cooperativas para explicar el acarreo de moléculas a través de la membrana. En el reposo la unidad A tiene una conformación tal que es estereoespecífica de la molécula L. La interacción de LA induce una señal conformacional e y así un cambio conformacional en B, de modo que esta última unidad es ahora estereoespecífica con respecto a L; al mismo tiempo, en virtud de la gaza de reacción i, la unidad A pierde su afinidad original por L, de suerte que L salta de A a B. El proceso puede repetirse a lo largo de una cadena de unidades. La afinidad original de A se restaura mediante la influencia alostérica (gasa u) de una unidad N situada en algún sitio en la cadena de efectos cooperativos. Al final de la cadena la molécula L no encuentra ninguna unidad estereoespecífica y queda libre en la fase acuosa.

bajo el efecto de la interacción antígeno-anticuerpo movimientos iónicos similares que también se atribuyeron a las modificaciones conformacionales inducidas en el anticuerpo por el antígeno. El experimento que quiero referir ahora (Fig. 6) es asimismo muy sugestivo de que, en efecto, los cambios conformacionales juegan un papel primordial en las acciones de la interacción del antígeno con el anticuerpo sobre los sistemas vivos. Se escogió como antígeno a la ferritina; una proteína que se caracteriza porque tiene un núcleo de un quelato de hierro²⁹ con una permeabilidad magnética de alrededor de 3.8 magnetones de Bohr³⁰ (Fig. 7). Se tomó la *tenia coli*, tejido que contiene músculo liso, un cierto tono y motilidad espontánea. Si el tejido tiene incorporada anti-ferritina y se le trata con la ferritina, la interacción molecular subsecuente produce una reacción típica de Schultz-Dale;³¹ es decir, una poderosa contracción del músculo. Cuando la reacción de Schultz-Dale ha cesado y después de dejar el tejido en reposo y en el refrigerador durante varias horas, la aplicación de un campo magnético relativamente pequeño determina una contracción tanto al cierre del circuito como a la apertura del mismo. El tejido sin tratar o tratado con otros pares inmunológicos (concretamente con albúmina-antialbúmina) no exhibe tal fenómeno biomagnético. Por consiguiente, hemos inferido que el campo magnético actúa sobre los agregados de ferritina-antiferritina. Se piensa entonces que el campo disloca al antígeno de los complejos de antígeno-anticuerpo

en sus lugares de fijación, o, más simplemente, inicia un cambio conformacional en los agregados, el cual es capaz de disparar el fenómeno fisiológico de la contracción. Al suprimir el campo magnético se produce un nuevo cambio conformacional o re-arreglo molecular y de nuevo la respuesta en el sistema.

Es posible, por supuesto, conforme con las interpretaciones ortodoxas del fenómeno de hipersensibilidad, que el campo magnético, determine un cambio conformacional, que éste dé lugar a la liberación de sustancias activas y que sean éstas las responsables del fenómeno de contracción. Sin embargo, la existencia de una acción directa es una explicación más sencilla y probable, la cual ya hemos tratado de fundamentar en otras ocasiones.^{13, 20, 32}

La aplicación del campo es en ocasiones sucesivas menos efectiva, seguramente debido al desarrollo de un estado refractario o desensibilización que, según se sabe, sigue al proceso de activación.^{18, 33} Esto explica asimismo por qué es necesario esperar un número de horas después de administrar la ferritina. La ferritina precipita una reacción y subsecuentemente desensibiliza. Cuando ha transcurrido un cierto tiempo el tejido recupera su sensibilidad, no obstante que los agregados permanecen formados en el seno del tejido.³⁴ De todos modos lo importante es que un dispositivo biológico para la trasducción magneto-mecánica se puede armar experimentalmente.

Otros sistemas transductores naturales, donde la señal es un cambio en la energía del medio ambiente, seguramente se rigen por el mismo principio

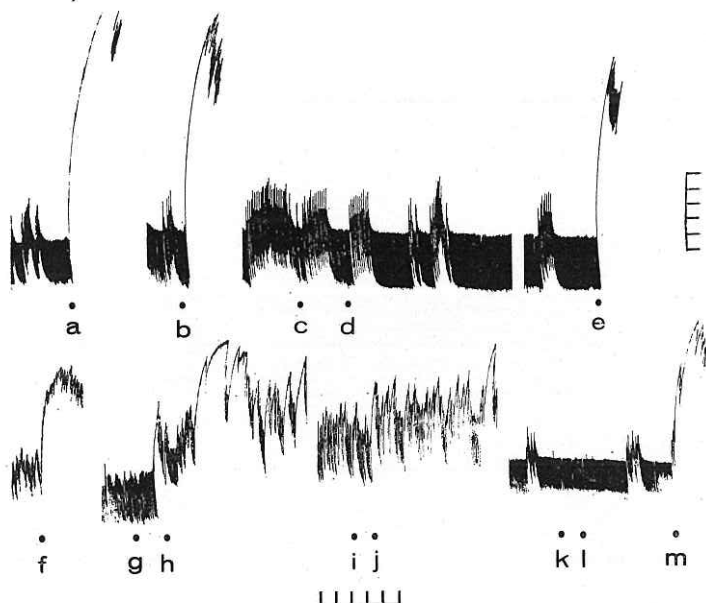


FIG. 6. Son trazos quimográficos de la actividad de dos fragmentos de *Tenia coli*, suspendidos en un baño de solución de Krebs a 38°C. El tejido está sensibilizado pasivamente *in vivo* contra la ferritina (0.5 ml de suero anti-ferritina inyectado por vía intravenosa 48 horas antes del experimento). El trazo superior muestra: *a*) la respuesta a una dosis de histamina cuya concentración final es de 1 $\mu\text{g/ml}$; *b*) una dosis de ferritina de 100 $\mu\text{g/ml}$ en la concentración final; *c*) se aplica un campo magnético alterno de 780 Gauss a través de la preparación; *d*) se suspende el campo magnético; *e*) nueva dosis de histamina a la misma concentración que en *a*). Obsérvese que el campo magnético en estas circunstancias no tiene respuesta alguna por parte del tejido. El trazo inferior muestra los efectos sobre el segundo fragmento de tejido. Este fue tomado del mismo animal, pero se dejó reposar en el refrigerador por 24 horas después de haber sido tratado con 100 $\mu\text{g/ml}$ de ferritina durante el mismo tiempo que en *b*); *f*) histamina 0.1 $\mu\text{g/ml}$; *g*) "on", 780 Gauss; *h*) "off" idem; *i*) "on" idem; *j*) "off" idem; *k*) "on" idem; *l*) "off" idem; *m*) histamina 0.1 $\mu\text{g/ml}$. Nótese el efecto "on-off" en la primera aplicación del campo. Los intervalos entre dos registros cortados de izquierda a derecha son como sigue: arriba: 24 min, 31 min y 20 min; abajo: 14 min, 25 min y 20 min. Las calibraciones son: tiempo, 1 minuto cada división; amplitud, 100 μ de acortamiento real cada división.

de la conformación-información que es la base del modelo de la excitabilidad a los agentes químicos. No es difícil

imaginar, por ejemplo, que las cargas eléctricas de ciertas macromoléculas de la membrana celular, colocadas en un

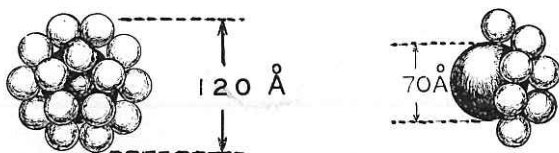


Fig. 7. Esta figura se presenta a fin de ilustrar la estructura de la ferritina. La ferritina cristalina contiene un núcleo esférico o miscela de un polímero de quelato de hierro. El núcleo está cubierto por una "cáscara" o cubierta formada por veinte idénticas subunidades proteínicas igualmente esféricas. La conformación más probable de la cubierta es un dodecahedro pentagonal con un pequeño espacio central en cada superficie pentagonal. Se piensa que operan en la macromolécula fuertes interacciones entre las subunidades proteínicas y que la miscela ejerce asimismo fuerzas que estabilizan el conjunto de partes de la ferritina. Sin embargo, los enlaces de las subunidades de proteína con el polímero central no son covalentes, sino que es verosímil que se trate de fuerzas de corto enlace. (Modificado de Pape et al²⁹).

gradiente eléctrico de hasta 100 000 voltios por centímetro actúen como puntos de aplicación de fuerzas y así se generen pares capaces de inducir cambios conformacionales. La molécula es entonces, un galvanoreceptor que luego transmite sus esfuerzos a las unidades lipoproteínicas vecinas. De hecho el potencial de acción de los axones se ha interpretado recientemente como un fenómeno biológico que corresponde a la cinética de los efectos cooperativos.³⁵ Las corrientes eléctricas que se hacen pasar como un estímulo a través de la membrana producen, cuando son de poca magnitud, cambios graduales y locales en el sitio donde se aplican; en esas circunstancias se encuentra una relación de proporcionalidad directa entre la magnitud del estímulo y la despolarización que se obtiene de la membrana. Pero un incremento suficiente del estímulo puede alcanzar un valor crítico o umbral que se reconoce porque entonces se produce un fenómeno sumamente enérgico que es el potencial de acción y que consiste en la inver-

sión brusca de la polaridad de la membrana en el sitio de aplicación del estímulo. Después, en ese sitio, se restablece la polaridad original. Sin embargo, el cambio eléctrico que se genera actúa como un estímulo útil para inducir el potencial de acción en los sitios vecinos, de modo que el fenómeno se propaga como una onda a lo largo del axón. El fenómeno se ha interpretado así:²⁵

Las corrientes de poca intensidad afectan unas cuantas unidades galvano-sensibles; éstas determinan cambios cooperativos dentro de un cierto dominio, pero la interacción entre los varios dominios es débil. Cuando, por el contrario, la intensidad del estímulo es suficiente, los efectos cooperativos interactúan en la periferia de los dominios, debido a que éstos se han expandido considerablemente y también a que se han involucrado mayor número de unidades moleculares galvanosensibles. Por consiguiente, a medida que el estímulo es mayor, la cooperación aumen-

ta, hasta el punto que se alcanza una *masa crítica* de unidades activadas. En pocas palabras: la probabilidad de cambio con cada estímulo se incrementa de modo muy significativo, con respecto a la misma probabilidad de cambio en las condiciones de reposo del sistema. Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que la idea de efectos cooperativos inducidos por las corrientes eléctricas, es en el momento tan interesante como audaz y que aguarda ser comprobada por el experimento. El hecho de que el tejido excitado por las corrientes que alcanzan el umbral, no tan solo despolarizan la membrana sino que invierten su polaridad, habla por sí mismo de un proceso de amplificación que se ha interpretado en términos operacionales según el modelo clásico de Huxley-Hodgkin como un proceso "regenerativo" o de reacción positiva.

Otro ejemplo, muy conspicuo, es el de las macromoléculas fotosensibles: los pigmentos visuales. La luz, un solo fotón ¡la partícula de energía! puede alterar ciertos grupos químicos de modo, de llevarlos de su estructura *cis* a su isómero *trans* y así activarlos.³⁶ Tales grupos son los carotenoides, los cuales son susceptibles de un proceso de *isomerización fótica*. Puesto que dos átomos de carbono están unidos por una doble ligadura, ésta fija la posición en el espacio de un carbono con respecto al otro, en vez de la rotación libre de que gozan los mismos cuando están unidos por ligaduras únicas. Si, entonces, un nuevo átomo de carbono se une a cada miembro del par, el compuesto se estructura según dos posibilidades dis-

tintas: en la posición *cis* los nuevos átomos se ligan al mismo lado de la doble ligadura, mientras que en la posición *trans* se colocan diagonalmente en posiciones opuestas. Se trata de dos estados metastables de la misma molécula.

La luz induce la isomerización en el sentido *cis-trans*. Pero la cuestión es que, para mayor abundamiento, el paso de un estado a otro representa un cambio conformacional muy radical. En efecto, el isómero *trans* es relativamente recto, mientras que el isómero *cis* se dobla en todos los puntos de la cadena atómica. Ya que el resto del pigmento es una proteína, la opsina, y que ésta se ajusta a la forma *cis* pero no se acopla a la forma *trans* del carotenoide, es verosímil que todo el proceso ulterior dependa de los cambios cooperativos que se organicen en la membrana de la célula fotosensible, como resultado de la interacción molecular primaria.

REFERENCIAS

1. Bichat, M. F. X.: *Reserches Physiologiques sur la Vie et la Mort*. París, 1880.
2. Sherrington, C. S.: *The Integrative Action of the Nervous System*. New Haven, Yale University Press, 1906.
3. Ehrlich, P.: *The Collected Papers of Paul Ehrlich*. Vol. I. London, Pergamon Press. 1956.
4. Croxato, R. y Huidobro, F.: *Fundamental basis of the specificity of pressor and depressor amines in their vascular effects*. V. *Theoretical fundaments: drug receptor linkage*. Arch. Int. Pharmacodyn. 106: 207, 1956.
5. Koshland, D. E.: *Catalysis in life and in the test tube* En: *Horizons in Biochemistry*. New York, Academic Press. 1962, p. 265.
6. Ariens, E. J.; Simonis, A. M. y Van Rossum: *Molecular Pharmacology*.

- Ariens, E. J. (Ed.) New York, Academic Press. 1964. Vol. 1, p. 119.
7. Belleau, B. y Lavoie, J. L.: *A biophysical basis of ligand-induced activation of excitable membrane and associated enzymes. A thermodynamic study using acetylcholinesterase as a model receptor*. Can. J. Biochem. 46: 1397, 1968.
8. Paton, W. D. M.: *Kinetic theories of drug action with special reference to the acetylcholine group of agonists and antagonists*. Ann. N. Y. Acad. Scienc. 144: 869, 1967.
9. Mautner, H. G.: *The molecular basis of drug action*. Pharmacol. Revs. 19: 107, 1968.
10. Karlin, A.: *Chemical modification of the active site of the acetylcholine receptor*. J. Gen. Physiol. 54: 245S, 1969.
11. Del Castillo, J.: *Sobre la naturaleza de los receptores sinápticos*. GAC. MÉD. MÉX. 98: 395, 1967.
12. Del Castillo, J.: *On the nature of synaptic receptors*. J. Amer. Oil Chem. Soc. 45: 313, 1968.
13. Alonso de Florida, F.: *Ideas sobre la excitación celular en la anafilaxia*. GAC. MÉD. MÉX. 94: 1027, 1964.
14. Del Castillo, J.; Alonso de Florida, F. y Gijón, E.: *Immunological induction of membrane receptors*. 6a. Reunión, European Biochemical Societies. Res. No. 74, 1969.
15. Sale, A. J. H. y Hamilton, D.: *Effects of high electric fields on microorganisms. III. Lysis of erythrocytes and protoplasts*. Biochem. Biophys. Acta 163: 37, 1968.
16. Frick, O. L.; Nye, W. y Raffel, S.: *Anaphylactic reactions to univalent haptens*. Immunol. 14: 563, 1968.
17. Valentine, R. C. y Green, N. M.: *Electron microscopy of an antibody-hapten complex*. J. Mol. Biol. 27: 615, 1967.
18. Mongar, J. L. y Schild, H. O.: *Cellular mechanisms in anaphylaxis*. Physiol. Rev. 42: 226, 1962.
19. Becker, E. L.: *Cellular mechanisms and involvement in acute allergic reactions*. Fed. Proc. 28: 1702, 1969.
20. Alonso de Florida, F.; Del Castillo, J.; García, X. y Gijón, E.: *Mechanism of the Schultz-Dale reaction in the denervated diaphragmatic muscle of the guinea pig*. J. Gen. Physiol. 51: 677, 1968.
21. Osler, A. G.: *Some cellular functions in acute allergic reactions*. Fed. Proc. 28: 1729, 1969.
22. Coombs, R. R. y Lachmann, P. J.: *Immunological reactions at the cell surface*. Brit. Med. Bull. 24: 113, 1968.
23. Barbaro, J. F.: *The release of histamine from rabbit platelets by means of antigen-antibody precipitates. I. The participation of the immune complex in histamine release*. J. Immunol. 86: 369, 1961.
24. Changeux, J. P. y Thiéry, J.: *On the excitatory and cooperativity of biological membranes. En: Regulatory Functions of Biological Membranes*. Jarnefelt, J. (Ed.) London, Elsevier Co. 1968, p. 116.
25. Lehninger, A. L.: *The neuronal membrane*. Proc. Nat. Acad. Sci. 60: 1069, 1968.
26. Levin, R. J.: *The Living Barrier*. London, Heinemann, 1969.
27. Del Castillo, J.; Rodríguez, A.; Romero, C. A. y Sánchez, V.: *Lipid films as transducers for detection of antigen-antibody and enzyme-substrate reactions*. Science 153: 185, 1966.
28. Del Castillo, J.; Rodríguez, A. y Romero, C. A.: *Pharmacological studies on an artificial transmitter-receptor system*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 144: 803, 1967.
29. Pape, L.; Multani, J. S.; Stitt, C. y Saltman, P.: *In vitro reconstruction of ferritin*. Amer. Chem. Soc. 7: 606, 1968.
30. Michaelis, L.; Coryell, G. D. y Granick, S.: *Ferritin. III. The magnetic properties of ferritin and some other colloidal ferric compounds*. J. Biol. Chem. 149: 463, 1943.
31. Dale, H. H.: *The anaphylactic reaction of plain muscle in the guinea-pig*. J. Pharmacol. Exper. Therap. 4: 167, 1913.
32. Alonso de Florida, F.: *Ciencia y creencias acerca del mecanismo de acción de los agentes químicos en los sistemas vivos*. GAC. MÉD. MÉX. 99: 609, 1969.
33. Schild, H. O.: *Mechanism of anaphylactic histamine release*. En: *Biochemistry of the Acute Allergic Reactions*. Austen, K. F. y Becker, E. L. (Eds.) Oxford, Blackwell Scientific Publ. 1968, p. 99.

34. King, C. A. y Francis, G. E.: *A study on the adsorption of antibody by chopped guinea pig lung and subsequent fixation of antigen*. *Immunochem.* 3: 347, 1966.
35. Watanabe, A.; Tasaki, I. y Lerman, L.: *Bi-ionic potentials actions in squid giant axons internally perfused with sodium salts*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 58: 2246, 1967.
36. Wald, G. *Life and light*. En: *The Control of Biochemical Reactions. Readings from Scientific American*. San Francisco, Freeman and Co. 1968, p. 294.
37. Changeux, J. P.: *The control of biochemical reactions*. En: *The Molecular Basis of Life*. Readings from Scientific American. San Francisco, Freeman and Co. 1968, p. 244.
38. Porter, R. R.: *The structure of antibodies*. En: *The Molecular Basis of Life*. Readings from Scientific American. San Francisco, Freeman and Co. 1968, p. 283.

LA MEMBRANA POSTSINÁPTICA

JOSÉ DEL CASTILLO,¹ IGNACIO ESCOBAR² Y ENRIQUE GIJÓN³

SUELE COMPARARSE el modo de operación de las sinapsis químicas con el de los amplificadores electrónicos. En éstos, la energía liberada en su salida no proviene de la contenida en la señal insertada en su entrada, sino de la denominada fuente de alimentación; baterías o red de energía eléctrica. La señal de entrada se limita a controlar o modular la liberación de la energía procedente de la fuente.

De forma parecida, la energía que estimula al músculo cuando a él llega el impulso motor, procede de una fuente postsináptica: la energía acumulada en la misma fibra muscular en forma de un potencial de reposo. La señal de entrada, presináptica, es el transmisor químico —acetilcolina— que difunde a través del espacio sináptico y alcanza, en pocos microsegundos, el sistema detector y amplificador de la membrana postsináptica.

La simple presencia de las moléculas de acetilcolina en la superficie de la fibra muscular, a nivel de la placa motora, determina un marcado aumento en la permeabilidad iónica de su membrana. Y esto equivale, eléctricamente, al establecimiento de un cortocircuito a través del cual el potencial de reposo se descarga, estimulando la célula.

El papel más central en este proceso está desempeñado por los denominados receptores sinápticos: áreas submicroscópicas de la superficie muscular, capaces, por un lado, de reconocer la presencia del transmisor y, por otro, de reflejar tal identificación en un cambio ultraestructural en la membrana. Pues es inevitable el admitir que si la permeabilidad de la membrana aumenta bajo la influencia del transmisor, su configuración a nivel molecular debe sufrir una alteración; un proceso que se conoce como *activación* del receptor.

La membrana plasmática es una tenue estructura formada por lípidos y proteínas. Por ello, las hipótesis propuestas para explicar la naturaleza de los mecanismos quimioceptores han sido construidas, inevitablemente, en torno de una u otra, o de ambas, sustancias.

¹ Académico honorario. Departamento de Farmacología, Escuela de Medicina, Universidad de Puerto Rico.

² Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquía, Medellín.

³ Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México.

La hipótesis de la naturaleza proteínica de los receptores es ciertamente atractiva. En efecto, sabemos que algunas proteínas, como los anticuerpos y las enzimas, poseen la capacidad de reconocer a otras moléculas, antígenos y substratos; es decir, son capaces de distinguir entre moléculas pequeñas que poseen estructuras parecidas. Y, además, se ha demostrado que su interacción con estas últimas va acompañada de un cambio en la configuración terciaria de la proteína, lo que ayudaría a explicar el cambio estructural que debe ocurrir en la membrana.

Las observaciones de Alonso de Florida y colaboradores¹⁻³ demostrando que los anticuerpos adsorbidos o incorporados a la membrana plasmática de fibras musculares denervadas, se comportan como receptores para los correspondientes antígenos, representan una demostración convincente de la capacidad de las moléculas protéicas para desempeñar el papel de receptores.

Otros experimentos que soportan de forma más directa la misma hipótesis, son los de Karlin y sus colaboradores. Kalin y Bartels,⁴ trabajando en electropilas aisladas del *Electrophorus electricus*, demostraron que la despolarización inducida por acetilcolina, carbacol y trimetilbutilamonio, es bloqueada si se trata la preparación con p-cloromercuriobenzoato (PCMB) o con ditiotreitól. El bloqueo producido por el PCMB puede ser anulado fácilmente con tioles, mientras que el debido a ditiotreitól desaparece por acción de agentes oxidantes. Posteriormente, Karlin y Winnik⁵ observaron que si se trata el receptor

reducido por ditiotreitól con N-etilmaleimida, un reactivo alquilante de los grupos -SH libres, se impide el efecto restaurativo de los agentes oxidantes.

Puede concluirse, por tanto, que el receptor colinérgico de la electroplaca posee una unión disulfuro, capaz de oxidarse y reducirse reversiblemente, que interviene de forma aún desconocida, pero crucial, en el proceso de activación.

En realidad, la idea de que las proteínas azufradas pueden desempeñar un papel esencial en el proceso de transmisión sináptica fue anticipada hace ya más de treinta años por el fisiólogo ruso Koshtoyanz con referencia a la sinapsis neuromuscular, al demostrar, con técnicas miográficas, que la cisteína restablece la transmisión en preparaciones fatigadas.^{6b}

Del Castillo, Nelson y Sánchez⁶ empleando técnicas electrofisiológicas, no lograron confirmar los resultados de Koshtoyanz. Pues, a pesar de observar que la cisteína produce un gran aumento en la acción despolarizante de la acetilcolina, vieron que este efecto no se debía a un cambio en los receptores, sino al hecho de que la resistencia eléctrica de la membrana muscular aumenta en el pH ácido producido al disolver clorhidrato de cisteína en Ringer sin amortiguador (véase también Brooks y Hutter⁷).

Los trabajos de Karlin y colaboradores, citados más arriba, nos indujeron a reexaminar este problema, y, muy en particular, a investigar el efecto de un número de reactivos que interfieren, en una u otra forma, con los grupos -SH

y puentes S-S, sobre los receptores de la placa motora.

Pensamos, además, que si la activación de los receptores colinérgicos consiste, según se ha sugerido repetidamente, desde Meyer⁸ y Nachmansohn,⁹ en un cambio en la configuración terciaria de una proteína sería, quizá, posible inducir cambios similares con tales reactivos.

Tiende a admitirse actualmente que las proteínas son estructuras flexibles y relativamente inestables. Su configuración, en un momento dado, parece depender de varios factores; y, entre ellos, del número relativo de grupos SH reducidos y oxidados.

Sería de esperar, por tanto, que los reactivos que interfieren con estos grupos alteren la estructura de la proteína receptora dando lugar a su activación.

Los resultados descritos en este artículo han confirmado plenamente estas ideas y hemos podido demostrar que tanto los reactivos que producen la formación de mercáptidos como los que oxidan los grupos -SH y varios metales pesados, exhiben una acción activadora sobre los receptores colinérgicos de la placa motora. Por otra parte, algunos tóxicos, en particular el 2-mercaptoetanol, ejercen una intensa acción potenciadora sobre la sensibilidad química de la placa motora.

Desde un punto de vista técnico nuestros experimentos debían reunir dos condiciones. Por un lado era preciso lograr una concentración relativamente alta del reactivo en la superficie de la placa motora. Por otro, la acción de estos reactivos debía restringirse a los

receptores, pues dada la ubicua distribución de las proteínas, estas sustancias ejercen efectos profundos a muy diversos niveles de la organización celular, con consecuencias difíciles de analizar.

Ambos requerimientos pueden lograrse, sin embargo, utilizando la técnica microelectroforética de aplicación de drogas de Nastuk¹⁰ y del Castillo y Katz.¹¹ Esta no sólo permite la aplicación extraordinariamente rápida y localizada de iones a los receptores, reduciendo el tiempo de difusión a unos cuantos milisegundos; sino que, usando pipetas múltiples, es posible investigar la interacción entre diversas drogas administradas a los mismos receptores.

Todos nuestros experimentos fueron realizados sobre el músculo sartorio aislado de la rana (*Rana pipiens*) enrollado, en espiral, sobre una barra de plástico, según describieron del Castillo y Katz,¹² cuyo trabajo debe ser consultado para otros detalles técnicos. El potencial de membrana de fibras musculares en la superficie interna del sartorio fue registrado con microelectrodos de vidrio llenos de KCl saturado, insertados en la vecindad de las terminaciones motoras.

Los diferentes reactivos fueron aplicados electroforéticamente a la superficie receptora con ayuda de micropipetas triples, uno de cuyos cañones se llenó siempre con carbamilcolina (carbacol). Pulsos de esta droga fueron utilizados para localizar los receptores. Y una vez que la punta de la pipeta estaba situada junto a ellos, se pasaron pulsos de corriente por los cañones llenos de los reactivos, viéndose así su

efecto sobre el potencial de reposo de la fibra muscular y sobre la amplitud de potenciales de carbacol.

Los reactivos ensayados, sus concentraciones en las pipetas, las abreviaturas con que serán designados en este artículo, y la dirección de la corriente necesaria para expulsarlos se recogen en la tabla 1.

vas cadenas laterales en la molécula proteínica, de tamaño diferente y diferente carga eléctrica según el reactivo utilizado.

La aplicación electroforética de cada uno de estos tres reactivos a los receptores va seguida de una despolarización de la membrana muscular, muy semejante a los "potenciales" producidos

TABLA I

Reactivo	Abreviatura	Concentración en la pipeta	Polaridad (*)
p-Cloromercuribenzoato	PCMB	1 g/400 ml	+
Acido p-mercurifenilsulfónico	PMFS	1 g/100 ml	+
Acetato de fenilmercurio	FM	1 g/600 ml	+
Glutación oxidado	GSSG	1 g/100 ml	+
Acido d-tiobis (2 nitrobenzoico)	DTNB	1 g/100 ml	+
2 Mercaptoetanol	2-ME	**	—
Glutación reducido	GSH	1 g/100 ml	+
Bicloruro de mercurio	HgCl ₂	1 g/ 13 ml	+
Cloruro de cadmio	CdCl ₂	1 g/ 0.7 ml	+
Cloruro de níquel	NiCl ₂ .6H ₂ O	1 g/ 0.5 ml	+
Sulfato ferroso	FeSO ₄ .7H ₂ O	1 g/ 2 ml	+
Sulfato de cobre	CuSO ₄ .5H ₂ O	1 g/ 5 ml	+
Nitrato de uranilo	UO ₂ (NO ₃) ₂ .6H ₂ O	1 g/ 0.8 ml	+
Sulfato de cobalto	CoSO ₄ .7H ₂ O	1 g/ 3 ml	+

* Potencial aplicado al interior de la pipeta con referencia a un electrodo de corriente sumergido en el baño.

** Se usó el 2ME líquido después de añadir unas gotas de una solución de NaOH para elevar su pH por encima de 9.

Dividiremos la descripción de los efectos observados de acuerdo con los diferentes tipos de acción química de los reactivos.

Formación de mercáptidos

Las tres sustancias de este tipo empleadas, PCMB, PMFS y FM, en las cuales el mercurio se comporta como ion monovalente, se combinan de forma altamente específica con los grupos -SH libres de las proteínas, dando lugar a la formación de mercáptidos. Este proceso equivale a la introducción de nue-

por acetilcolina y carbacol. Sin embargo, la administración de los mismos reactivos a la superficie de la fibra muscular, fuera de la placa motora, no tiene efectos apreciables sobre el potencial de reposo, aun cuando la cantidad de mercurial aplicado exceda con mucho las dosis necesarias para despolarizar la región receptora. Puede concluirse, por tanto, que la despolarización producida por estos compuestos se debe a un efecto directo sobre los receptores y no a una mera lesión química, microscópica, de la membrana.

Los registros *a* y *c*, de la figura 1, ilustran la despolarización producida por el PCMB (*a*) y el PMFS (*b*). En general, la efectividad, o potencia despolarizante relativa, de estos compuestos es menor que la de acetilcolina y carbacol, aunque, en ocasiones, trabajando con PMFS hemos observado despolarizaciones de hasta 6.7 mV/nC;

es decir, del mismo orden de magnitud que las obtenidas con drogas colinérgicas.

Los potenciales inducidos por PCMB, PMFS y FM pueden ser reproducidos en el mismo sitio de la placa motora, a frecuencias de 1/seg. o mayores, durante varios minutos, sin que ni su amplitud ni su curso temporal cambien; siempre, naturalmente, que la posición de la punta de la pipeta y la intensidad de los pulsos de corriente permanezcan constantes.

El mecanismo de la acción despolarizante de estos compuestos no es fácil de explicar, aunque podemos asumir que su combinación con la proteína receptora da lugar a un cambio de configuración similar, al menos en lo que se refiere a sus efectos sobre la permeabilidad de la membrana, al inducido por la acetilcolina o carbacol.

A pesar de la escasez de datos expe-

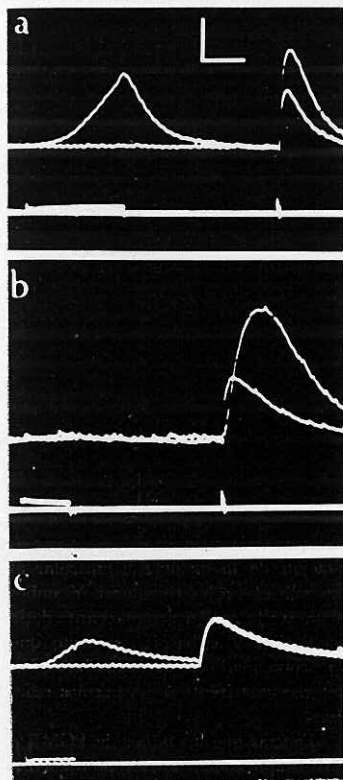


FIG. 1. Efectos de la aplicación electroforética de PCMB (*a* y *b*) y PMFS (*c*) a los receptores de la placa motora. Cada fotografía muestra, superpuestos, dos barridos del osciloscopio. El primero de cada par ilustra el efecto de un pulso de carbacol, aplicado aisladamente, que da lugar al potencial más bajo de la derecha (en *a* y *b*; en *c* son iguales). En el segundo barrido un pulso del mercurial orgánico precedió al pulso de carbacol. En *a* el potencial de PCMB aumentó la despolarización producida por el carbacol. En *b*, el pulso de PCMB produjo una despolarización apenas perceptible pero también potenció considerablemente el efecto del carbacol. En *c*, se ve un potencial de PMFS que no va seguido de potenciación de la acción del carbacol. El trazo inferior en cada fotografía muestra la corriente que pasa por los dos cañones. Calibraciones: Vertical, *a* y *b* 5 mV; *c*, 10 mV; Horizontal, 0.1 seg. para todos. Calibración vertical para la corriente *a* y *b*, 10×10^{-7} A; *c*, 5×10^{-7} A.

rimentales sobre este problema, la posibilidad que los reactivos que forman mercáptidos produzcan cambios secundarios en la configuración de la molécula proteínica ha sido enfatizada por Boyer¹³ con referencia a enzimas. Uno de los estudios que soportan esta idea es el de Green, Ingram y Perutz¹⁴ quienes cristalizaron un derivado de la hemoglobina en la que dos grupos SH de cada molécula habían reaccionado con PCMB. A pesar de que los cristales de esta substancia eran isomorfos con los de la hemoglobina ordinaria, sus patrones de difracción de rayos X estaban alterados.

Es interesante el hecho de que todos los mercuriales orgánicos hasta ahora investigados poseen una acción despolarizante, a pesar de las diferencias existentes entre las nuevas cadenas laterales a que dan lugar. Tanto el PCMB, que posee un grupo carboxilo cargado negativamente, como el FM, que carece de carga una vez combinado con la proteína, producen una despolarización. Sería deseable, sin embargo, saber si los potenciales de equilibrio a que tienden ambas despolarizaciones son iguales.

Además de tal acción despolarizante, los mercuriales orgánicos, particularmente el PCMB, ejercen una acción facilitadora sobre los potenciales de acetilcolina y carbacol, como se ilustra en los registros *a* y *b* de la figura 1. En *a*, que muestra superpuestos dos barridos del osciloscopio, vemos como la amplitud del potencial de carbacol se potencia por un factor de 1.7 cuando es producido después del potencial de PCMB. El registro *b* enseña que no es

necesaria la producción de despolarización para que se manifieste el efecto potenciador del PCMB. El pulso de este reactivo no tuvo, esta vez, efectos despolarizantes, pero potenció la acción del carbacol por un factor de 2.0. Por último, en el registro *c*, el potencial de PMFS no va seguido de potenciación.

En vista de estas observaciones es posible imaginar que el cambio incitado por la acetilcolina en el receptor implique un cambio o movimiento en la cadena peptídica que se facilite al introducirse una nueva cadena lateral a nivel de los grupos -SH. En realidad, se ha sugerido¹⁵ que la formación de tales cadenas puede favorecer la inestabilidad de la proteína debido a las alteraciones producidas en los campos eléctricos locales. Es posible, también, que los grupos -SH libres contribuyan a estabilizar la proteína, quizás formando uniones de hidrógeno.

Oxidación de los grupos -SH

Se usaron dos reactivos, caracterizados por su enérgica acción oxidante sobre los grupos -SH, el GSSG y el DTNB. Ambos ejercen las mismas acciones. Ambos, al igual que los mercuriales orgánicos producen una despolarización de la membrana muscular al ser aplicados a los receptores. Y ambos bloquean la acción despolarizante de la acetilcolina y carbacol; un efecto que va acompañado de la desensibilización del receptor frente a los mismos reactivos.

Mientras que los pulsos de PCMB o PMFS aplicados a los receptores a in-

tervalos regulares dan lugar a "potenciales" cuya amplitud, como indicamos, permanece constante por mucho tiempo, la despolarización producida por los agentes oxidantes se extingue a menudo espontáneamente después de unos cuantos pulsos. En otras palabras, la activación del receptor inducida por la oxidación de sus grupos SH es un fenómeno que exhibe un grado considerable de taquifilaxis, aunque se recupera después de un periodo de reposo.

La sensibilidad de los receptores a los reactivos oxidantes de los grupos -SH, y la reversibilidad de sus efectos inhibidores, varía mucho con la preparación y la sinapsis individual que se examina. En algunas fibras, sobre todo en preparaciones frescas, es posible despolarizar la membrana repetidamente, aplicando pulsos de oxidante a frecuencias de 1-1.5/seg. Sin embargo, es más común ver como la despolarización inducida por los oxidantes desaparece en unos cuantos pulsos.

La figura 2 ilustra los efectos que acabamos de describir. En ella hay, superimpuestos, tres barridos del osciloscopio. El primero exhibe un solo potencial de carbacol (marcado con *a*). En el segundo barrido se aplicó un pulso largo de GSSG (*b*) que produjo una despolarización lenta sobre la que se suma un potencial de carbacol cuya amplitud está ya reducida. En el tercer barrido (*c*), por último, la despolarización producida por el oxidante ha disminuido mucho, y como puede verse, el potencial de carbacol es mucho menor y más lento.

La autoextinción de la despolarización

inducida por los agentes oxidantes parece ser paralela a la inhibición de los potenciales producidos por el carbacol, lo que sugiere que ambos fenómenos pueden depender del mismo cambio en la proteína receptora.

Las observaciones anteriores sugieren que la oxidación de los grupos -SH va acompañada de un cambio en la configuración, en la proteína receptora parecido al que tiene lugar durante la activación fisiológica del receptor.

Tioles y sustancias reductoras

Se investigaron dos reactivos de este tipo: 2-ME y GSH. El primero de ellos ha mostrado poseer una acción extraordinariamente constante y reproducible; su aplicación a los receptores va acompañada de una potenciación considerable de los potenciales de acetilcolina y carbacol. Esto puede demostrarse o bien aplicando pulsos de 2-ME inmediatamente antes de los pulsos de acetilcolina o carbacol, como se ilustra en la figura 3 (véase la leyenda), o "inundando" la superficie receptora mediante una corriente continua de 2-ME. La intensidad de los pulsos y corrientes de esta sustancia necesarios para observar una potenciación de las drogas colinérgicas es mucho mayor que la que debe fluir, usualmente, por los cañones de carbacol o acetilcolina para producir despolarización.

En algunos casos, no obstante, puede observarse un antagonismo entre el 2-ME y el carbacol o la acetilcolina. Cuando, por ejemplo, el pulso de la droga colinérgica se superpone sobre el de 2-ME, la despolarización produ-

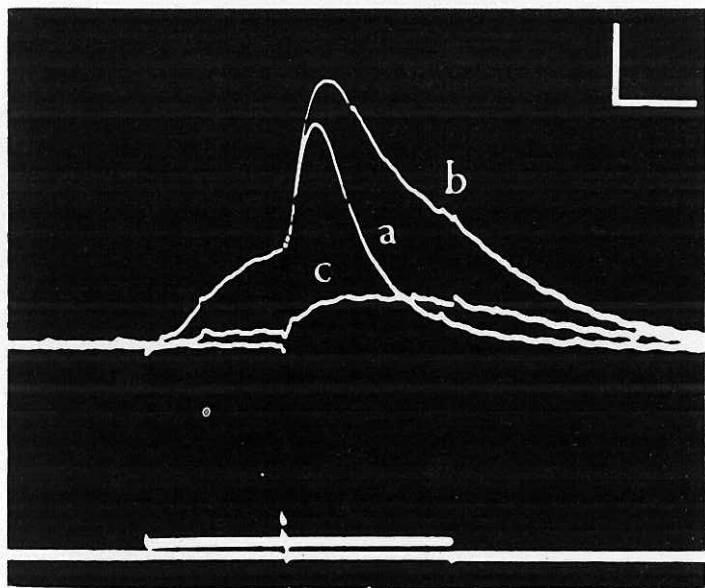


FIG. 2. Efecto de la aplicación electroforética de GSSG. Esta fotografía muestra tres barridos superimpuestos. En *a* se aplicó solamente un pulso de carbacol. En *b*, el pulso de carbacol fue impuesto sobre el pulso más largo de GSSG; como puede verse el GSSG indujo una despolarización lenta sobre la que se sumó el potencial de carbacol. En el tercer barrido, la despolarización inducida tanto por el GSSG como por el carbacol disminuyó considerablemente. Calibraciones: Vertical: 5mV y 10×10^{-7} A; Horizontal: 50 mseg.

cida disminuye, e incluso llega a desaparecer por completo. Lo mismo ocurre, a veces, cuando se pasa por el cañón de 2-ME una corriente continua intensa mientras se aplican pulsos al cañón de carbacol.

Como para expulsar de la pipeta el 2-ME es necesario emplear una corriente negativa, puede uno atribuir tal antagonismo a un mero artefacto técnico; al arrastre o succión eléctrica de los cationes colinérgicos al interior del ca-

ñón de 2-ME. No estamos convencidos, sin embargo, de que esta sea la única explicación, pues en algunas ocasiones, al aumentar gradualmente la intensidad de la corriente de 2-ME, hemos visto como los potenciales de carbacol han disminuido primero para después aumentar, y por otra parte, no parece haber una correlación clara entre la intensidad de la corriente de 2-ME y la disminución o desaparición de los potenciales de carbacol. No hemos estudia-

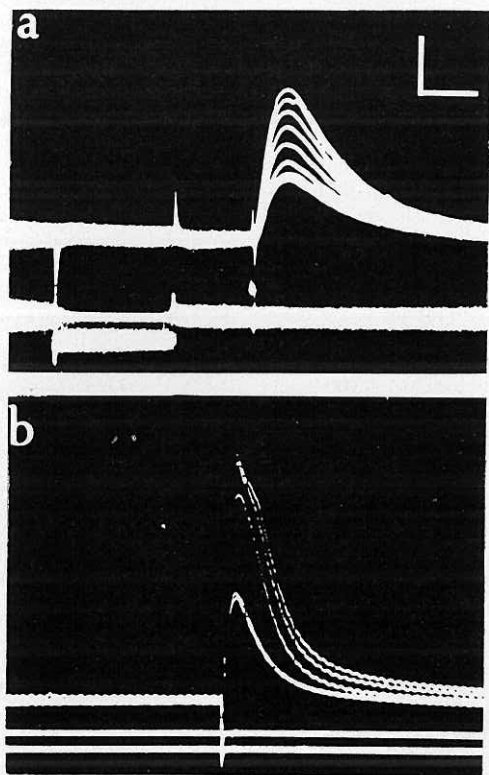


FIG. 3. Acción potenciadora del 2-ME sobre los potenciales de carbacol. En *a* la amplitud de la despolarización inducida por pulsos de carbacol, de intensidad constante, aumenta gradualmente cuando son precedidos de pulsos (negativos) de 2-ME. El potencial de carbacol en la ausencia de 2-ME es el menor de los ocho potenciales registrados. En *b* el potencial de carbacol aumenta al inundar la región receptora por una corriente continua de 2-ME. Calibraciones: Vertical: 5 mV y 10×10^{-7} A; Horizontal: *a*, 50 msec; *b*, 0.1 seg.

do aún sistemáticamente estas interacciones, que pueden depender, también, de la geometría de cada micropipeta

múltiple. Preferimos, por tanto, dejar el problema abierto.

La acción potenciadora del 2-ME

sobre los potenciales de acetilcolina y carbacol se ha observado siempre, incluso en músculos recién disecados, no expuestos aún a ninguna droga; lo que parece indicar que incluso en estas preparaciones es posible alterar el equilibrio entre los grupos SH libres y las uniones disulfuro en favor de los primeros. Sin embargo, la intensidad del efecto potenciador del 2-ME parece ser mayor en sinapsis tratadas previamente con agentes oxidantes o metales pesados.

El GSH ejerce efectos menos reproducibles. En realidad, hemos observado dos tipos de acciones de esta sustancia, una semejante a la del 2-ME, y otra similar a la producida por GSSG; lo que puede explicarse por la oxidación espontánea del GSH en el interior de las pipetas.

Iones de metales pesados

Se han investigado los efectos de la aplicación electroforética de Hg^{++} , Cd^{++} , Ni^{++} , Fe^{++} , Cu^{++} , UO_2^{++} , y Co^{++} . De ellos, solamente el ion mercuríco se considera como un reactivo específico de los grupos -SH, pues los restantes metales pueden combinarse con otros grupos funcionales de la proteína que contienen nitrógeno y oxígeno; siendo capaces, por tanto, de romper enlaces de hidrógeno no sólo dentro de la proteína sino, también, entre las proteínas y los lípidos de la membrana.

Se conoce, no obstante, que estos iones bloquean, reversiblemente, la excitabilidad y la conducción nerviosa^{16, 17} y creímos interesante, por ello, investigar sus efectos sobre los receptores colinérgicos; particularmente, por la capaci-

dad que poseen estos iones de distorsionar la molécula proteínica, al combinarse simultáneamente con dos grupos SH y formar puentes de tipo S-Me-S.

Todos los iones metálicos que se probaron ejercieron dos acciones. La primera es una despolarización, que se observa solamente cuando se aplican a los sitios de la membrana sensibles a la acetilcolina o carbacol, careciendo de acciones apreciables sobre el resto de la fibra muscular. La segunda es un bloqueo de la acción despolarizante de la acetilcolina y carbacol.

La figura 4 ilustra los efectos de pulsos de Hg^{++} (a), Cu^{++} (b) y Co^{++} (c), aplicados antes de pulsos de carbacol. Nótese como el pulso de cobre, a pesar de producir solamente una pequeña despolarización, bloqueó totalmente el potencial de carbacol.

La potencia despolarizante de los diversos iones metálicos varía considerablemente. Es máxima para el mercurio, y mínima para el cobre y cadmio, como se ve en la figura 5, donde se expresa la despolarización máxima observada para cada metal en términos de mV por nC; así como la razón de las despolarizaciones máximas para cada metal y el carbacol.

También varía la acción inhibitoria o bloqueadora de cada metal, que es máxima en el cobre y uranilo; ion este último que exhibe una taquifilaxis semejante a la observada con agentes oxidantes.

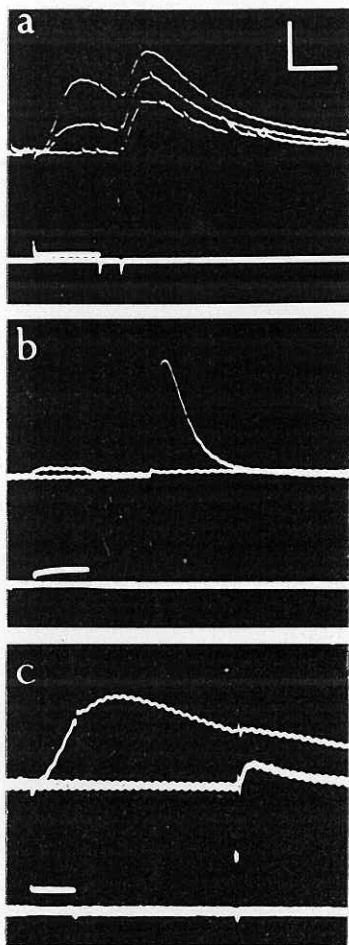
Un aspecto interesante de la acción despolarizante de los metales pesados es su reversibilidad; es decir, el hecho de que puedan producirse "potenciales de

metal" un gran número de veces en el mismo punto de la superficie de la fibra, sin que la efectividad de los pulsos

disminuya. La única excepción a esta regla es, como acabamos de mencionar, el ion uranilo, aunque sus efectos pueden invertirse por el 2-ME.

Tal reversibilidad no parece ser única, pues se conocen varios ejemplos de la desaparición espontánea de la inhibición producida en algunas enzimas por el ion Hg^{++} y los mercuriales orgánicos,¹⁵ un proceso que ha sido atribuido a una redistribución del metal en la preparación.

Teniendo en cuenta los resultados descritos en las secciones precedentes, podemos intentar interpretar las dos acciones ejercidas por los iones metálicos. La primera, o sea la despolarización, puede atribuirse a dos factores: i) a la formación transitoria de mercáptidos del tipo $R-S-Me^+$ y ii) a la formación de puentes del tipo $S-Me-S$, un fenómeno parecido al proceso oxidativo. La acción inhibitoria sobre el carbacol es, quizá, debida a la persistencia transitoria (excepto en el caso del ion uranilo) de tales puentes después del pulso.



←

FIG. 4. Registros ilustrando los resultados de la aplicación electroforética de iones de metales pesados. En *a* se ven tres potenciales de carbacol. Dos de ellos van precedidos por potenciales de Hg^{++} , inducidos por los pulsos largos de la izquierda. En *b*, se ve como el potencial de carbacol es reducido considerablemente por un pulso de iones de Cu^{++} que produjo, de por sí, una despolarización muy pequeña. En *c*, por último, se ve un potencial de Co^{++} seguido por un pulso de carbacol. Calibraciones: Vertical: *a*, 2 mV; *b*, y *c*, 5 mV y 10×10^{-7} A. Horizontal: 0.1 seg.

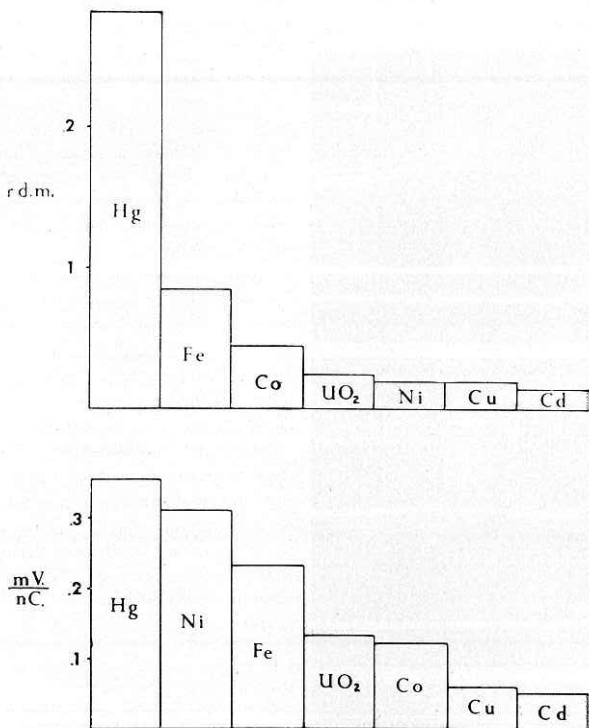


FIG. 5. Potencia despolarizante relativa exhibida por los distintos metales pesados ensayados. En la gráfica inferior se recogen las despolarizaciones máximas observadas con cada metal, expresadas en milivoltios por nanoculombio. En la superior aparecen los mismos resultados después de corregirlos tomando en cuenta la "eficiencia" y geometría de cada micropipeta múltiple. Para ello, las despolarizaciones máximas producidas por cada metal se han dividido por la potencia relativa de los pulsos de carbalcol correspondientes a la misma posición de la pipeta. Las razones de las despolarizaciones (r.d.m.), destacan más la efectividad del mercurio seguida por el hierro y el cobalto.

DISCUSIÓN

Los resultados que se acaban de describir refuerzan la hipótesis de la naturaleza proteínica de los receptores colinérgicos y están en consonancia no sólo con los resultados mencionados de Koshtoyanz, Alonso de Florida, Karlin y sus colaboradores, sino con los más recientes de Karlin y Winnik⁵ y Changeux, Podleski y Meunier.¹⁸ Autores estos últimos, que han empleado la técnica de marcación de proteínas por afinidad, de gran utilidad para el estudio de anticuerpos y enzimas (Fenton y Singer,¹⁹ Wofsy y Michaeli,²⁰) en el análisis del bloqueo de la respuesta de la electroplaca al carbacol por el yoduro de 4-(N-maleimido) feniltrimetilamonio, una sustancia que bloquea el receptor colinérgico y solamente si la preparación se ha tratado previamente con ditiotreitol, y con p-(trimetilamonio-benceno-diazonio-fluoroborato).

Por otro lado, nuestras observaciones suministran material abundante para especular sobre los posibles mecanismos moleculares que determinan, o acompañan, la activación del receptor.

Hemos visto, ante todo, que el proceso de activación requiere la presencia de grupos -SH libres en la proteína receptora. Y el hecho de que al tratar los receptores con 2-ME se potencie considerablemente la acción de la acetilcolina y carbacol indica que, incluso en preparaciones frescas, no todos los grupos SH estén reducidos y dispuestos a participar en el proceso de activación.

Debe mencionarse, en este lugar, que hemos encontrado diferencias muy significativas por lo que se refiere a sus

respuestas a algunos de los reactivos empleados entre los músculos recién extraídos del animal y aquellos mantenidos a 5°C durante 48 horas. Así, la potenciación de los efectos de acetilcolina y carbacol por el PCMB se observa exclusivamente en preparaciones frescas. En las que han permanecido dos días en la nevera no solo está ausente tal potenciación, sino que las respuestas al PCMB tienden a extinguirse espontáneamente después de varios pulsos. También se han encontrado diferencias similares en los efectos del cobre, mercurio y agentes oxidantes.

Tal envejecimiento de la preparación puede interpretarse como debido a una desnaturalización parcial de la proteína receptora, acompañada de un aumento en la tendencia a formar mercáptidos —o sea, a una disminución en su capacidad de reducir o regenerar grupos -SH libres.

Como hemos visto, tanto la formación de mercáptidos, como la oxidación de los grupos SH van acompañados de activación, pero es difícil adivinar cuáles puedan ser las consecuencias comunes de tales modificaciones sobre la configuración del receptor. Una hipótesis atractiva, pero puramente especulativa, es el asumir que esos cambios afecten de algún modo las relaciones entre la proteína y los lípidos de la membrana.

Es bien conocido el hecho de que la membrana plasmática posee una consistencia fluida, que se hace aparente siempre que al introducir un microelectrodo en la célula y al retirarlo después, vemos como se sella rápidamente, sin que en la misma se produzcan solu-

ciones de continuidad permanentes. No sería de extrañar, por tanto, que un rasgo fundamental en la función del receptor estuviese representado por la producción de fugas o cortocircuitos iónicos momentáneos, cuando la proteína altere su forma; o, como propuso Watkins²¹ cuando ciertos enlaces entre la proteína y las cabezas polares de los fosfolípidos se rompan transitoriamente.

Nuestras observaciones sugieren, además, que la proteína receptora puede existir en dos estados diferentes; reposo (R) y actividad (A). La reacción $R \rightarrow A$ se caracterizaría por producir activación, pero ésta no tiene lugar cuando la proteína se altera en la dirección contraria $A \rightarrow R$.

En el estado R, los grupos SH estarían reducidos, y el grado de activación producido por la reacción $R \rightarrow A$ dependería del número de estos grupos. Cuando la reacción $R \rightarrow A$ es inducida por agentes oxidantes, los grupos SH de la proteína permanecerían, a menudo, oxidados y el receptor quedaría desensibilizado a las drogas colinérgicas. Podemos preguntarnos también si, en general, el proceso de activación implica una oxidación, o por lo menos, favorece tal proceso.

Los cambios en el equilibrio dinámico entre los grupos SH y S-S de la proteína en reposo inducidos por el 2-ME podrían favorecer el proceso de activación, como parece suceder la mayoría de las veces, pero también podrían impedirlo en algunas ocasiones lo que, quizá, explicaría el antagonismo que a veces se ha observado entre el 2-ME y el carbacol.

No somos los primeros en proponer que una alteración del equilibrio entre los grupos SH y las uniones S-S de una proteína membranacea tengo como consecuencia un cambio de permeabilidad. Las investigaciones de Rasmussen, Echwarz y sus colaboradores,^{22, 23, 24} sobre la acción de la vasopresina en la vejiga urinaria del sapo, llevaron a la conclusión de que esta hormona se une a los tejidos a través de un enlace disulfuro que se forma como consecuencia de un intercambio entre un grupo -SH del receptor y otra unión disulfuro presente en la misma hormona.

Esta observación les indujo a especular sobre el mecanismo responsable del aumento de la permeabilidad vesical para el agua inducido por dicha hormona. Y aunque ven que existen, por lo menos, tres diferentes posibilidades, las tres hipótesis descansan sobre una base común: un cambio en la configuración de una proteína receptora producido como consecuencia de una alteración en el equilibrio entre sus grupos azufrados.

Para concluir, debemos señalar que en el curso de estos experimentos hemos podido observar que los reactivos que atacan los grupos SH y uniones S-S, ejercen también efectos muy marcados sobre las terminaciones nerviosas presinápticas, pero éstos serán objeto de un estudio separado.

Las investigaciones descritas en este artículo han sido realizadas con ayuda de los siguientes donativos: Research Grants Nos. NS-05235 y NS-07464 Career Research Award No. K6N-14938 y Postdoctoral Fellowship No. TW 1471. Todos de los National Institutes of Health, U.S. Department of Health, Education and Welfare.

REFERENCIAS

1. Alonso de Florida, F.: *Ideas sobre la excitación celular en la anafilaxia*. GAG. Méd. Méx. 94: 1027, 1964.
2. Alonso de Florida, F.; Del Castillo, J.; González, C. C., y Sánchez, V.: *On the pharmacological and anaphylactic responsiveness of denervated skeletal muscle of the guinea-pig*. Brit. J. Pharmacol. 25: 610, 1965.
3. Alonso de Florida, F.; Del Castillo, J.; García, X., y Gijón, E.: *Mechanism of the Schultz-Dale reaction in the denervated diaphragmatic muscle of the guinea-pig*. J. Gen. Physiol. 51: 677, 1968.
4. Karlin, A. y Bartels, E.: *Effects of blocking sulfhydryl groups and of reducing disulfide bonds on the acetylcholine-activated permeability system of the electroplax*. Biochim. Biophys. Acta 126: 525, 1966.
5. Karlin, A. y Winnik, M.: *Reduction and specific alkylation of the receptor for acetylcholine*. Proc. Nat. Acad. Sci. 60: 668, 1968.
- 5b. Koshtoyanz, K. S.: *Dependence of the influence of motor and sympathetic nerves on skeletal muscle upon the reactive groups of proteins*. C. R. Acad. Sci. U.R.S.S. 72: 981, 1950.
6. Del Castillo, J.; Nelson, T. E. Jr., y Sánchez, V.: *Mechanism of the increased acetylcholine sensitivity of skeletal muscle in low pH solutions*. J. Cell. Comp. Physiol. 59: 35, 1962.
7. Brooks, A. E. y Hutter, O. F.: *The influence of pH on the chloride conductance of skeletal muscle*. J. Physiol. 163: 9P, 1962.
8. Meyer, K. H.: *La perméabilité des membranes. V. Sur l'origine des courants bioélectriques*. Helv. Chim. Acta, 20: 634, 1937.
9. Nachmansohn, D.: *Metabolism and function of the nerve cell*. Harvey Lect. Ser. 49: 57, 1953.
10. Nastuk, W. L.: *Membrane potential changes at a single muscle end-plate produced by transitory application of acetylcholine with an electrically controlled microjet*. Fed. Proc. 12: 102, 1953.
11. Del Castillo, J. y Katz, B.: *On the localization of acetylcholine receptors*. J. Physiol. 128: 157, 1955.
12. Del Castillo, J. y Katz, B.: *A study of curare action with an electrical micro-method*. Proc. Roy. Soc. B. 146: 339, 1957.
13. Boyer, P. D. y Schulz, A. R.: *Some aspects of protein structure in relation to the role of -SH and -S-S- groups in enzyme catalysis*. En: *Sulfur in Proteins*. Benesch, P. (Ed.). New York, Academic Press, Inc., 1959, p. 213.
14. Green, D. W.; Ingram, V. M. & Perutz, M. F.: *Sign determination by the isomorphous replacement method*. Proc. Roy. Soc. A. 225: 287, 1954.
15. Webb, J. L.: *Enzyme and Metabolic Inhibitors*. Vol. 2, Cap. 4: *Sulfhydryl reagents*. New York, Academic Press, Inc. 1966, p. 635.
16. Schmitt, F. D. y Skow, R. K.: *The mechanism of the arsenite action on medullated nerve*. Am. J. Physiol. 111: 711, 1935.
17. Del Castillo-Nicolau, J. y Hufschmidt, H. J.: *Reversible poisoning of nerve fibers by heavy metal ions*. Nature 167: 146, 1951.
18. Changeux, J. P.; Podleski, T., y Meunier, J. C.: *On some structural analogies between acetylcholinesterase and the macromolecular receptor of acetylcholine*. J. Gen. Physiol., 54: 225S, 1969.
19. Fenton, J. W. Singer, S. J.: *Affinity labeling of antibodies to the p-azophenyltrimethylammonium hapten and a structural relationship among antibody active sites of different specificities*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 20: 315, 1965.
20. Wofsy, L. y Michaeli, D.: *Affinity labeling of the anionic site of acetylcholinesterase*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 58: 2296, 1967.
21. Watkins, J. C.: *Pharmacological receptors and general permeability phenomena of cell membranes*. J. Theoret. Biol. 9: 37, 1965.
22. Rasmussen, H.; Schwartz, I. L.; Schoessler, M. A. y Hochster, G.: *Studies on the mechanism of action of vasopressin*. Proc. Nat. Acad. Sci. 46: 1278, 1960.
23. Schwartz, I. L.; Rasmussen, H.; Schoessler, M. A.; Silver, L., y Fong, C.T.O.: *Relation of chemical attachment to physiological action of vasopressin*. Proc. Nat. Acad. Sci. 46: 1288, 1960.
24. Fong, C. T. O.; Silver, L.; Christman, D. R. y Schwartz, I. L.: *On the mechanism of action of the antidiuretic hormone (vasopressin)*. Proc. Nat. Acad. Sci. 46: 1273, 1960.