

CÉLULAS, GELES Y LOS MOTORES DE LA VIDA
Un Nuevo Enfoque Unificador de la Función Celular
Gerald H. Pollack

CÉLULAS, GELES Y LOS MOTORES DE LA VIDA
Un Nuevo Enfoque Unificador de la Función Celular
Gerald H. Pollack

para Seth, Ethan y Mia

.....ellos hicieron que todo valiera la pena

AGRADECIMIENTOS

Para producir un libro de este tipo uno queda en deuda con varias personas. Es difícil saber por donde empezar.

Desde la perspectiva fundacional, reconozco cálidamente la influencia de Gilbert Ling. Conocí a Gilbert en una reunión en Hungría a mediados de la década de 1980. Allí descubrí un nuevo mundo conceptual. Se tornó claro que un acercamiento a la fisiología celular ortogonal al conocimiento actual tenía un mérito considerable y disfrutaba de un apoyo experimental apreciable por parte de un cuadro de científicos intelectualmente independientes. Ling ha sido una fuerza continua no sólo entre aquel grupo, sino también para mí mismo. Sin su influencia, este trabajo nunca habría empezado.

Luego, reconozco el estímulo intelectual provisto por mis estudiantes y colegas en mi laboratorio, muchos de los cuales han adquirido un profundo interés en esta área temática. Primero entre ellos estuvo Marc Bartoo, cuya influencia ayudó a moldear los primeros capítulos del libro, y Fritz Reitz, cuyos sugerencias creativas y escepticismo con ojos de lince ayudaron desde el principio hasta el final.

Los estudiantes y colegas también ayudaron con las críticas capítulo a capítulo. A veces, debo admitir que estuve no menos que encantado con su honestidad brutal. Pero al final, estas críticas condujeron a un producto que es bastante más lúcido y menos investido de una lógica fofa de lo que había sido el caso inicialmente. Críticas serviciales también fueron aportadas por mis estudiantes en mi clase introductoria a la biomecánica celular y molecular, a quienes les estoy agradecido. Entre los colegas y estudiantes quienes contribuyeron mucho más allá del cumplimiento del deber en esta veta, particularmente agradezco a: Kevin Anderson, Marc Bartoo, Félix Blyakhman, Dwayne Dunaway, Mark Fauver, Outi Hyyti, Fetah Kosar, Justin Mih, Thomas Neumann, Megan Peach, Brian Rabkin, Fritz Reitz, Nate Segerson, Betty Sindelar y Paul Yang.

Un libro cuyo espectro es tan amplio como el de este menciona temas que están más allá de la esfera de experticidad de cualquier autor individual. Por ello envíe borradores a colegas a quienes considero como expertos en estos diversos temas. Uno o dos respondieron con hostilidad, y reconozco su buena voluntad para contestar preguntas de seguimiento que me ayudó a comprender por qué este enfoque podría ser tan difícil de digerir para algunos. Fundamentalmente, las respuestas estaban llenas de aliento y eran ricas en retroalimentación servicial. Esta crítica constructiva condujo a un libro considerablemente más libre de errores y mala interpretación que su versión inicial. De más está decir que cualquier persistencia de errores es responsabilidad mía, no la de ellos.

Entre los colegas cuya ayuda marcó una diferencia real, me gustaría mencionar a: Joe Andrade, Shu Chien, Wei-Chin, Jim Clegg, Rainer Gulch, Harold Hillman, Linda Hufnagel, Sir Andrew Huxley, Hiromasa Ishiwatari, Paul Hanmey, Ed Korn, Gilbert Ling, Pascale Mentré, Charlotte, Omoto, Seth Pollack, Fred Sachs, Ichiji Tasaki, Lars Thuneberg, Pedro Verdugo, Erwin Vogler y Maish Yarmuch. No puedo agradecer suficientemente a esta ocupada gente por compartir su sabiduría conmigo.

El arte que llena este volumen fue creado enteramente por David Olsen. Supe que David era el hombre correcto cuando sonrió por primera vez a la vuelta de la esquina. David era uno de esos extraños estudiantes de arte que era también estudiante de bioquímica. Hacia el momento en que había comenzado, ya había ilustrado un libro propio, sobre el tema de enseñar inglés a niños chinos. Repetidas veces yo esbozaba meramente un concepto y David aparecería a los pocos días con el primer boceto de un diseño intuitivo. Pienso que el lector estará de acuerdo en que el material gráfico de David es imaginativo, ocasionalmente voluble, y consistentemente claro. Ha sido un placer trabajar con David –completamente comprensivo respecto de las fechas de entrega, inusualmente tolerante respecto de mis excesivas demandas de revisión, y placenteramente agradable al máximo. Le agradezco calurosamente.

También agradezco a Don Scott por un concienzudo trabajo de edición del manuscrito. El ojo astuto de Don ayudó a minimizar la fraseología torpe, a clarificar mi intento, y a des-mezclar mis metáforas. Heidi Mair fue servicial, exacta y tranquilizadora en garantizar permisos y reunir referencias oscuras.

Finalmente, agradezco a mi compañera de vida, Emily Freedman, y al resto de mi familia por aguantarme durante los varios años que tomó preparar este libro. Durante mañanas tempranas y tardías noches, yo podía ser hallado dándole al procesador de texto en vez de a la aspiradora. Emi ha sido extremadamente comprensiva y halagüeña a lo largo de este extenso proceso y sólo puedo prometerle que el próximo libro será más corto.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	vi
PREFACIO	x
SECCIÓN I. HACIA LA PURA VERDAD	1
Esta sección se ocupa de las visiones de la biología celular generalmente aceptadas. Mediante el descascarado de estratos de supuestos, intenta llegar al corazón de la verdad. Al fin de cuentas, se llega a una conclusión no ortodoxa respecto de la naturaleza de la célula.	
1. <i>Derrumbando Mitos</i>	3
2. <i>El Gruñido de la Célula Moribunda</i>	25
3. <i>Incomodidad Citoplasmática</i>	39
SECCIÓN II. CONSTRUYENDO DESDE LOS CIMIENTOS	51
Esta sección investiga la función celular elemental, con énfasis sobre el agua y las superficies proteicas. Vemos cómo la interacción entre estos dos elementos puede dar surgimiento al particionamiento iónico, el potencial celular, y varios otros de los rasgos distintivos más básicos de la fisiología celular de formas que difieren con las explicaciones vigentes.	
4. <i>Agua</i>	53
5. <i>Solutos</i>	77
6. <i>Iones</i>	87
7. <i>Potenciales Celulares</i>	99
SECCIÓN III. UNA HIPÓTESIS PARA LA FUNCIÓN CELULAR	111
Cimentada en los capítulos previos, esta sección propone la hipótesis de que la función celular se parece a la función de un gel. Examina el rol central de la transición de fase en geles, y contempla el potencial para un rol similar en células.	
8. <i>Transición de fase: Un Mecanismo para la Acción</i>	113
SECCIÓN IV. UNA APROXIMACIÓN A LA DINÁMICA CELULAR	131
Esta sección busca detalles de una activa función celular. Basada en los capítulos previos, explora la posibilidad de un fundamento subyacente común para la acción celular –la transición de fase.	
9. <i>Secreción</i>	133
10. <i>El Potencial de Acción</i>	145
11. <i>Transporte</i>	163
12. <i>Transporte con Gracia</i>	175
13. <i>División celular</i>	207
14. <i>Contracción Muscular</i>	225
SECCIÓN V. ATANDO CABOS SUELTOS	249
Esta sección considera asuntos comunes a los capítulos precedentes. Comienza con la evolución celular y la energética, y luego prosigue para explorar los temas subyacentes que integran el material del libro.	
15. <i>Energía</i>	251

16. Un Nuevo Paradigma para la Función Celular	267	7
REFERENCIAS	285	
INDEX	299	

PREFACIO

Este libro trata sobre la célula y cómo funciona. Los libros sobre la función celular se han vuelto un lugar común, pero el enfoque tomado aquí no es para nada común. Se basa en principios fundamentales de la física y la química más que en reconocidos constructos en el nivel más alto. La premisa es que los paradigmas funcionales de la naturaleza son elegantes, simples, y probablemente demasiado menos enrevesados de lo que el saber corriente da a entender que son. El objetivo del libro es el de identificar estos paradigmas simples a partir de los fundamentos físicos y químicos.

La historia comienza con una curiosa escena descrita en el libro de texto de biología celular estándar por Alberts *et al.* (Primera edición, pág. 604). Una célula reptante de algún modo consigue atascarse sobre la superficie subyacente. El borde de ataque sigue presionando hacia adelante, se libera desmembrándose, y continúa su travesía hacia el frente como si ignorase la pérdida de su extremo trasero.

Algo respecto de esta perspectiva parece no estar en orden. Se nos ha enseñado que la función celular depende de la integridad de la membrana celular; sin embargo, la membrana de esta célula ha sido rasgada partiéndose en dos y la célula continúa funcionando como si nada de esto importase. Sigue con sus asuntos como siempre –aún a pesar de que la célula fue realmente decapitada.

Cuando fui expuesto a esta escena por primera vez, reaccioné de la manera en que ustedes podrían estar haciéndolo –de algún modo la célula deberá volver a cerrarse herméticamente. La membrana tiene que extenderse sobre las superficies dentadas, cubriendo la herida y restaurando la integridad celular. Me predispuse a aceptar este relato aparentemente endeble aunque no pude comprender cómo una membrana de doble capa conformada por moléculas con una firme empaquetadura lateral podría desplegarse por sobre una extensión tal como la de una nueva mitad. Aún así, pareció oportuno archivar esta anomalía y continuar hacia adelante con asuntos más importantes; otros podrían explicar algo respecto de lo que podría estar pasando.

Con el tiempo, se tornó claro que la supervivencia de la célula decapitada era apenas un ejemplo entre un conjunto de anomalías relacionadas. Las células sobreviven a diversas injurias equivalentes a ser guillotinado, arrastrado y descuartizado, y completamente agujereado a balazos con balas eléctricas (Capítulo 2). Si la destrozada membrana no vuelve a sellarse –y ninguna evidencia que he visto me convence de que el “re-sellado” sea algo más que un recurso convenientemente invocado –la implicación es que la integridad de la membrana podría ser menos consecuente de lo que se esperaba.

A partir de esta comprensión surge el material temprano de este libro. Si la integridad de membrana no es esencial, entonces ¿qué mantiene los contenidos dentro de la célula? Si están dispuestos a considerar al citoplasma como un gel en vez de una solución acuosa común, entonces podremos tener a mano una respuesta, ya que los geles no se desintegran necesariamente cuando son rebanados; los contenidos no se derramarán.

La naturaleza geliforme del citoplasma conforma el basamento de este libro. Los biólogos reconocen el carácter geliforme del citoplasma, pero no obstante

ello, los libros de texto se basan en un comportamiento tipo solución acuosa. Un gel es bastante diferente a una solución acuosa –es una matriz de polímeros a la cual el agua y los iones se aferran. Este es el motivo por el cual los postres de gelatina retienen agua, y por lo cual un huevo partido se siente empalagoso.

El concepto de un citoplasma gelatiforme resulta estar repleto de poder. Brinda una explicación para el característico particionamiento iónico entre el interior y el exterior de la célula (Capítulo 6). También explica el potencial eléctrico de la célula: potenciales de magnitud sustancial pueden ser detectados en geles tanto como en células demembradas (Capítulo 7). Por ende, el carácter gelatiforme del citoplasma justifica los rasgos distintivos básicos de la biofísica celular.

El foco entonces vira desde la estática a la dinámica. Aquí también la cuestión es si las explicaciones adecuadas pueden emerger a partir del carácter geliforme del citoplasma. Contrariamente a la percepción común, los geles no son inertes. Con una modesta instigación, los geles de polímero atraviesan transiciones estructurales que pueden ser tan profundas como lo es el cambio desde hielo a agua, lo cual constituye el motivo por el que son clasificadas como transiciones de fase. Las transiciones de fase de geles poliméricos son aprovechadas comúnmente en productos cotidianos abarcando desde píldoras de liberación controlada a lo largo del tiempo hasta pañales descartables. Tienen un inmenso potencial funcional.

El hecho de que la célula pueda explotar un potencial tan funcional constituye el foco de la segunda mitad del libro. Yo exploro la posibilidad de que la transición de fase pudiese ser un denominador común de la función celular. Por función celular me refiero a transporte de material, motilidad, división, secreción, comunicación, contracción –entre otras funciones esenciales.

Entonces así es como están las cosas. Impulsado por la noción de simplicidad, yo sugiero que mucho de la función biológica celular podría estar gobernado por un único mecanismo unificador –la transición de fase. Esta es una noción embriagadora, que debería ser enfrentada con el debido escepticismo. Sin embargo, es un rumbo deducible naturalmente si el citoplasma y sus organelas funcionales son geliformes, dado que la transición de fase es el agente funcional central del gel. El tema fundamental de este libro es la posibilidad de que los geles comunes y los geles citoplasmáticos podrían operar mediante el mismo principio de funcionamiento.

El libro está diseñado para aquellos con mínimos conocimientos de biología. Podría haber sido escrito como para expertos, rico en teoría y denso en detalles. Mi experiencia, sin embargo, es que una inmersión demasiado profunda a menudo oscurece la lógica subyacente –o la falta de ésta. La estrategia consiste en exponer el material al escrutinio mediante el enfoque en los principios subyacentes. Como tal, el material debería plantear una dificultad pequeña para los estudiantes de cualesquiera de las ciencias físicas, biológicas o de ingeniería –ya sean graduados o estudiantes universitarios. De hecho, la respuesta frente a los borradores me convence de que el material debería ser accesible para cualquier persona inteligente dotada de una curiosidad sin prejuicios.

Para mantener ecualizado el texto, he adoptado un punto medio entre el referenciamiento extensivo típico de los trabajos académicos y la ausencia total de referenciamiento característica de los libros laicos. Las referencias me parecieron necesarias en áreas controversiales, pero me sentí libre de omitirlas en áreas en las cuales sentí que eran más estándar. Espero que esta omisión sea disculpada. También espero ser perdonado por haber pasado por alto el trabajo que podría haber consumido la vida de alguien, o por no haber logrado citar algún trabajo que podría parecer conflictivo. Puedo asegurarles que ninguna de tales omisiones fue intencional.

Pude haber transmitido la impresión de que todo el contenido de este libro es original, pero ese no es el caso. Los rasgos distintivos físicos del complejo proteína-agua-ión han sido elaborados antes por un grupo de pioneros científicos incluyendo a Albert Szent-Györgyi, A. S. Troshin y Gilbert Ling. Ling en particular ha dedicado su larga profesión a avanzar corajudamente las fronteras de la ciencia enfrentando una frecuente irrisión por el aparente extremismo de sus visiones. Según mis cálculos las evidencias apoyan poderosamente sus constructos. De hecho, el hilo de sus ideas entreteje la mismísima estructura de este libro, particularmente los primeros capítulos. El material sobre transiciones de fase se basa en aportes seminales del difunto Toyo Tanaka del MIT, quien elaboró los mecanismos subyacentes a las transiciones de fase y pronosticó su relevancia biológica. En gran parte, el libro vincula principios naturales anticipados por otros, sumando unos pocos pensamientos aquí y allá para integrar estos principios y ensanchar su relevancia.

El resultado es un fresco panorama sobre la forma en que funciona la célula. Los panoramas frescos no compatibilizan bien con los establishments científicos y no soy tan inocente como para pensar que las ideas ofrecidas aquí serán adoptadas con entusiasmo, incluso si algunas características puedan ser estimadas como atractivas. Para el beneficio del progreso, sin embargo, el mantenimiento de un paradigma competidor en paralelo al de uno ortodoxo puede ser provechoso, ya que los defectos en ambos pueden ser expuestos con mayor facilidad. Pero el reto del mantenimiento dual no es fácil –quizás no más fácil que el desafío de tener dos amantes y permanecer fiel a ambos al mismo tiempo. Es no obstante en este constructivo espíritu que les ofrezco este nuevo paradigma.

GHP
Seattle, Noviembre, 2000

La ciencia está construida en base a la premisa de que la Naturaleza contesta las preguntas inteligentes inteligentemente; de modo que si no existe respuesta alguna, deberá haber algún error en la pregunta.

Albert Szent-Györgyi, *El Estado Viviente; Con Observaciones sobre el Cáncer*, Academic Press, 1972.

SECCIÓN I

HACIA LA PURA VERDAD

Esta sección se ocupa de las visiones de la biología celular generalmente aceptadas. Mediante el descascarado de estratos de supuestos, intenta llegar al corazón de la verdad. Al fin de cuentas, se llega a una conclusión no ortodoxa respecto de la naturaleza de la célula.



Epículos

CAPÍTULO 1: DERRUMBANDO MITOS

Hace mucho tiempo, los científicos creían que el centro del universo era la Tierra: el sol podía ser visto atravesando el cielo, de modo que era lógico concluir que la tierra debía hallarse en el punto central.

Pero esta visión eventualmente se topó con dificultades. A medida que el crecimiento de la matemática incrementó el poder de la astronomía, se hizo posible calcular los senderos orbitales. Los desplazamientos de los planetas alrededor de la tierra resultaron ser menos simples de lo que se esperaba; cada planeta seguía una órbita denominada epiciclo (Ilustración, opuesta), el cual era suficientemente intrincado como para implicar que seguramente había algo que no encajaba.

Aquello que no encajaba dejó de ser un misterio. A pesar de que la persistente noción de un universo con la Tierra como centro podría gratificar nuestros egos colectivos, Galileo demostró que era el Sol el que mantenía este honor. Con el sol en el centro del sistema solar, los caminos orbitales ya no requirieron más epiciclos complejos; se tornaron mucho más simples. Lo que anteriormente parecía una hipótesis razonable apoyada por una observación visual aparentemente indisputable, resultó siendo absolutamente equivocado. Un paradigma complicado fue reemplazado por uno más simple.

¿ES LA VIDA TAN DIFERENTE AHORA?

Al menos en el campo de la biología celular, los paradigmas complicados plantean una preocupación similar. En la superficie todo parece estar en orden. Virtualmente todos los procesos celulares conocidos ya están explicados por mecanismos bien descritos: los iones fluyen a través de canales; los solutos son transportados por bombas; las vesículas son movidas por motores; *etc.* Para cada problema hay una solución. Pero como veremos a medida que investiguemos bajo la superficie de estas soluciones, un desconcertante nivel de complejidad insinúa una situación que podría paralelar a los epiciclos.

Propongo que retrocedamos y nos reagrupemos. Para un progreso genuino, los conceptos fundacionales deben ser incuestionablemente sensatos; de otra forma un edificio de comprensión puede erigirse sobre una grieta de incertidumbre –ningún problema aparente hasta que el edificio crece lo suficiente en peso como para resquebrajar los cimientos y derrumbarse hacia el abismo. Se necesita identificar el terreno firme.

Comienzo por considerar dos elementos que se pensaba eran fundamentales para la función celular: las bombas y canales de membrana. Las bombas transportan solutos a través de la frontera en contra de sus respectivos gradientes de concentración. Los canales permiten que los solutos se escurran de nuevo en la dirección opuesta. A través de un equilibrio entre el transporte basado en bombas y la fuga en base a canales, se piensa que el característico particionamiento de solutos e iones se halla consolidado.

Tabla 1.1. Concentración de los principales iones adentro y afuera de una típica célula de mamífero.

ión	Peso Molecular	Concentración Intracelular (mM)	Concentración Extracelular (mM)
Na	23	5-15	145
K	39	140	5
Cl	35.5	5-15	110

Por ello, la concentración de potasio es relativamente más alta adentro de la célula, y la de sodio es relativamente más alta afuera (Tabla 1.1).

Que las bombas y los canales existen parece no haber la menor duda –o para ponerlo en términos más precisos, la existencia de proteínas con rasgos distintivos parecidos a bombas o parecidos a canales no puede ponerse en duda. Los genes que codifican para estas proteínas han sido clonados, y las proteínas en sí mismas se han estudiado exhaustivamente. No puede haber motivo alguno por el cual su existencia pudiese ser desafiada.

Donde podría quedar alguna duda es respecto del rol funcional de estas proteínas. Lo que estaré considerando en este capítulo es si estas proteínas realmente median el particionamiento iónico. Por el hecho de que una “bomba” insertada dentro una membrana artificial pueda translocar un ión desde un lado de la membrana hacia el otro, ¿podemos estar seguros que el particionamiento iónico en la célula viviente necesariamente sucede merced al bombeo?

La tarea de comprobar esta presunción puede ser abordada en este caso a través del portal de la perspectiva histórica. Los científicos en la vanguardia desestiman a menudo la historia por considerarla irrelevante, pero en esta instancia particular resulta especialmente reveladora una breve mirada a través de las huellas del descubrimiento.

ORÍGENES

La emergencia de bombas y canales fue precedida por el concepto de la membrana celular. Éste surgió durante la era de la microscopía de lámpara, previamente a la época en la que alguna membrana semejante pudiese ser realmente visualizada. Los biólogos de comienzos del siglo XIX observaron que un bulto de citoplasma, descrito como una “sustancia pulposa, homogénea, gelatinosa” (Dujardin, 1835) no se mezclaba con la solución circundante.

Para explicar por qué no se disolvía esta sustancia gelatinosa, surgió la idea de que debía estar envuelta por una película impermeable al agua. Esta película podría impedir que la solución circundante permeara adentro del citoplasma y lo disolviera. La naturaleza de la película membranosa tuvo dos variantes sugeridas. Kühne (1864) la concibió como una capa de proteína coagulada, mientras que Schültze (1863) la imaginó como una capa de citoplasma condensado. Dadas las limitaciones experimentales de la era, la naturaleza de la película putativa, todavía no visualizable, permaneció incierta.

La idea de una película invisible fue aún así atractiva para muchos de los científicos de la época, y crecientemente le fueron otorgados atributos especiales. De esta manera, Theodore Schwann (1839) veía a esta película como “previa en importancia respecto de su contenido”. La membrana creció en significancia para convertirse en la sede supuesta de mucho de la actividad de la célula. Sin embargo esta visión no era aceptada por todos. Max Schültze, a menudo calificado como el padre de la biología moderna, descartó del todo la evidencia respecto de una película citoplasmática, y en lugar de ello consideraba a la célula como “pequeños grumos de protoplasma carentes de membrana con un núcleo” (Schültze, 1861). A pesar de la prominencia de Schültze, el concepto de una membrana envolvente se mantuvo con firmeza.

La idea moderna de que la barrera membranosa podría ser semipermeable provino del fisiólogo vegetal Wilhelm Pfeffer. Pfeffer estaba al tanto del trabajo en curso de Thomas Graham (1861), quien había estado estudiando los coloides, que son grandes moléculas suspendidas indefinidamente en un medio líquido –por ejemplo, la leche. Según las observaciones de Graham, los coloides no podían pasar a través de membranas de diálisis aunque el agua sí. Para Pfeffer, aparentaban parecerse al citoplasma. Si la membrana de diálisis fuese como la membrana de la célula, razonó Pfeffer, el interior de la célula no se disiparía hacia el fluido circundante incluso a pesar de que la membrana todavía pudiese ser permeable al agua. De esta forma surgió la idea de la membrana semipermeable.

Pfeffer hizo suya la idea de la membrana semipermeable y la siguió. Condujo experimentos sobre modelos de membrana confeccionados con ferrocianuro de cobre, los cuales se comportaban bastante como membranas de diálisis en que podían escurrir el agua fácilmente pero los solutos con enorme dificultad. Fue sobre estos experimentos que Pfeffer basó la teoría moderna de la membrana celular (Pfeffer, 1877). A esta altura se creía que la membrana era permeable al agua, pero poco más.

A pesar de que la teoría de Pfeffer se mantuvo durante algún tiempo, sufrió serios percances cuando sustancias que se presumía eran incapaces de atravesar la membrana resultaron capaces de hacerlo. La primera y quizás más significativa de estas sustancias fue el potasio. El reconocimiento, a comienzos del siglo veinte, de que el potasio podía fluir hacia adentro y afuera de la célula (Mond y Amson, 1928; Fenn y Cobb, 1934), provocó una reconsideración fundamental de la teoría.

ORÍGEN DEL CANAL

Enfrentados a la necesidad de explicar el tema de la permeabilidad al potasio, Boyle y Conway (1941) propusieron una solución elegante: el canal de potasio. Ya que se sabía que el ión de potasio hidratado era más pequeño que el ión de sodio hidratado, 3,8 Å versus 5 Å, Boyle y Conway sugirieron canales transmembrana de un tamaño crítico –suficientemente amplios para el paso del potasio y su cubierta de agua asociada, pero tan pequeños como para excluir al sodio con su cubierta. La membrana era, de hecho, un tamiz que admitía el paso de iones pequeños, pero excluía a los más grandes.

La teoría del cedazo atómico de Boyle-Conway era atractiva en cuanto también podía explicar varios rasgos conocidos del comportamiento celular sin

demasiada dificultad. Explicaba la acumulación de potasio dentro de la célula como una atracción a las proteínas negativamente cargadas de la célula (el así llamado efecto Donnan). Explicaba el potencial celular como surgente a partir de una separación de carga a través de la membrana (un efecto capacitivo). Y justificaba los cambios del volumen celular que podían ser inducidos por cambios en la concentración externa de potasio (un efecto osmótico). La teoría del cedazo parecía explicar tanto de forma tan coherente que inmediatamente se le concedió un exaltado prestigio.

Pero surgió otro problema, quizás incluso más grave que el primero. La membrana resultó siendo permeable también al sodio (Fig. 1.1). El advenimiento del sodio radiactivo hizo posible rastrear la trayectoria de los iones de sodio, y un cuadro de investigadores prontamente descubrió que el sodio efectivamente atravesaba la frontera celular (Cohn y Cohn, 1939; Heppel, 1939, 1940; Brooks, 1940; Steinbach, 1940). Este hallazgo creó un problema, porque el ión de sodio hidratado era más grande que los canales postulados para alojar al potasio; los iones de sodio deberían haber sido excluidos, pero no lo fueron. De este modo, la teoría del cedazo atómico colapsó.

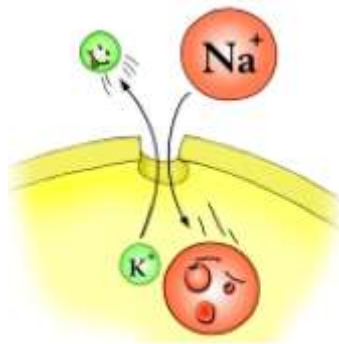


Figura 1.1. Teoría del cedazo atómico. Se postuló que el tamaño del cedazo atómico era el factor crítico para permitir que el potasio atravesara y bloqueara al sodio. La observación del pasaje de sodio comprometió la teoría.

A pesar del colapso, el concepto del canal transmembrana continuó siendo atractivo. Uno tenía que empezar en algún sitio. Un marco basado en el canal podía eludir el problema del sodio con canales separados para el sodio y el potasio: si la selectividad se basara en algún otro criterio que el del tamaño, entonces los canales distintos podían bastar. Un canal separado para el sodio pudo entonces justificar el escurrimiento de iones de sodio hacia dentro de la célula.

Pero la fuga del sodio introdujo todavía otro dilema, de naturaleza diferente. Ahora el sodio podía pasar a través del canal, fluyendo en descenso por su gradiente de concentración y acumulándose adentro de la célula. ¿Entonces cómo podía el sodio intracelular quedar en una concentración tan baja como la que presenta?

ORÍGEN DE LA BOMBA

La solución fue bombearlo hacia fuera. De un modo más o menos igual a como una bomba de cárter extrae el agua que ha filtrado dentro de vuestro sótano, se postuló una bomba de membrana para librar a la célula del sodio que de otra forma se habría acumulado adentro.

La idea de una bomba de membrana en realidad se originó antes del problema del sodio. Empezó a comienzos del siglo pasado con Overton, un prominente fisiólogo que había anticipado la idea de que la membrana estaba hecha de

lípidos. Al darse cuenta de que algunos solutos podían cruzar una membrana lipídica por lo demás impermeable, Overton postuló una especie de actividad secretoria para manejar estos solutos. Por medio de la energía metabólica, la membrana podría de tal forma secretar, o bombear, ciertos solutos hacia dentro o fuera de la célula.

El concepto de bomba resurgió alrededor de cuarenta años más tarde (Dean, 1941), para responder específicamente al problema de la permeabilidad al sodio. Dean no tenía en mente un mecanismo de bombeo en particular; de hecho, la bomba de sodio fue propuesta como la menos objetable de las alternativas. Por lo tanto, Dean comentaba, “Es más seguro suponer que existe una bomba de mecanismo desconocido la cual está haciendo un trabajo a un ritmo constante excretando sodio tan rápidamente como este difunde hacia dentro de la célula”. Con esto, la bomba de sodio (más tarde, la bomba de intercambio Na/K) llegó a la existencia.

Hacia mediados del siglo veinte, por lo tanto, la célula había adquirido ambos, canales y bombas. Con canales para el potasio y el sodio, junto con bombas para restaurar los gradientes iónicos perdidos a través del escurrimiento, la electrofisiología de la célula parecía estar firmemente afianzada. La Figura 1.2 lo dice todo.

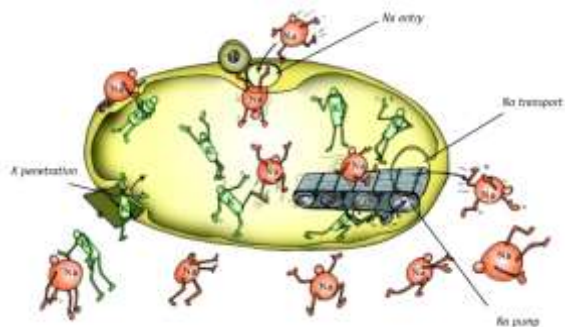


Figura 1.2. La bomba de sodio, adaptado a partir de un dibujo de Wallace Fenn (1953), uno de los pioneros en el tema.

REFLEXIONES

¿Por qué los he arrastrado a través de una reseña tan extensa? Mi propósito era demostrar cómo surgieron los canales y las bombas. No nacieron porque algún científico despabilado tropezó con ellos durante una agotadora sesión en el microscopio electrónico, sino como hipótesis *ad hoc* necesarias para remendar teorías que de lo contrario estarían en decadencia. El canal surgió cuando se constató que una membrana putativamente impermeable a iones permitía el paso del potasio; el canal podía dejar pasar potasio mientras se excluyen adecuadamente al sodio y a otros iones hidratados más grandes. Luego, se supo que el sodio ingresaba a la célula y en lugar de reconsiderar el concepto del canal, se postuló un segundo canal específico para el sodio. La permeabilidad del sodio también implicó una persistente filtración hacia adentro de la célula. Para impedir que los gradientes colapsen, se postuló una bomba de sodio.

Una vez que este marco de referencia hipotético se afianzó, se expandió ilimitadamente. Por la misma razón que era necesaria una bomba de sodio, también se tornó evidente que se necesitaban bombas para otros solutos. Virtualmente todos los solutos de la célula particionan muy por fuera del equilibrio electroquímico (Stein, 1990) y por ello necesitan ser bombeados. Las bombas de hidrogeniones, las bombas de calcio, de cloruro y las bombas de

bicarbonato para mencionar algunas, pronto nacieron además de las bombas de sodio/potasio postuladas. Sin embargo, incluso hacia la cima de esta intensa actividad, Glynn y Karlsh (1975) tuvieron que admitir a regañadientes en su clásica revisión que no obstante el enorme empuje de trabajo experimental sobre el tema, ninguna hipótesis existía todavía para explicar cómo bombean las bombas.

El campo de los canales explotó similarmente. Con el advenimiento de la técnica del parche-abrazadera (ver luego) a fines de la década de 1970, los investigadores habían adquirido la capacidad de estudiar lo que parecían ser canales para iones individuales. Durante un tiempo pareció que se estaban identificando nuevos canales prácticamente en forma mensual, muchos de estos aparentemente selectivos para un ión o soluto particulares. La cantidad de canales ha aumentado hasta bastante más que 100. Inclusive nacieron canales de agua (Dempster *et al.*, 1992). Se llevó a cabo un elegante trabajo para tratar de comprender cómo los canales podían lograr su jactanciosa selectividad (Hille, 1984). Por lo menos algunos canales, en apariencia, podían admitir un ión o soluto selectivamente, a pesar de excluir la mayoría de los otros.

Dada la sorprendente expansión de la actividad en estas áreas, ¿podía haber algún fundamento concebible para la duda? ¿No deberían los conceptos de bombeo y canalización hallarse tan firmemente cimentados como cualquier principio biológico? Es tentador contestar poniendo lado a lado los experimentos clave a los cuales originalmente se les adujo confirmar el bombeo y la canalización junto con los retos publicados respecto de esos experimentos (Troshin, 1966; Hazlewood, 1979; Ling, 1984, 1992). Dudo en recapitular ese debate porque los retos son en gran parte técnicos. Los lectores deseosos de invertir algo de tiempo en familiarizarse con los detalles técnicos son invitados a consultar estas fuentes y considerar si las preocupaciones publicadas son válidas o no.

Otro enfoque es considerar la evidencia que podría hallarse potencialmente en conflicto con estos conceptos. A diferencia de los teoremas matemáticos, las teorías científicas no pueden ser comprobadas. Sin importar cuanta evidencia pueda ser ordenada en apoyo a una teoría, siempre resulta posible que se descubra alguna nueva pieza de evidencia que no encaje, y si tal evidencia es a la vez sólida y fundamental, la teoría podría requerir una reconsideración. Como podremos ver en las próximas secciones, ciertas cuestiones básicas concerniendo a las bombas y los canales todavía no han sido manejadas adecuadamente.

NUEVA VISITA A LOS CANALES

La existencia de canales para iones individuales pareció ser confirmada por experimentos controversiales utilizando la técnica del parche-abrazadera. En esta técnica, la punta de una micropipeta se posiciona sobre la superficie de la célula. Mediante succión, un parche de membrana es arrancado de la célula y queda adosado en el orificio de la micropipeta (Fig. 1.3 A). Un arco voltaico estable se dispone a través del parche, y se mide el flujo de corriente resultante a través del parche. Esta corriente no es continua; discurre como una salva de pulsos discretos. Dado que los pulsos parecen ser cuánticos en tamaño, se asume que cada pulso corresponde a la apertura de un canal para un ión individual.

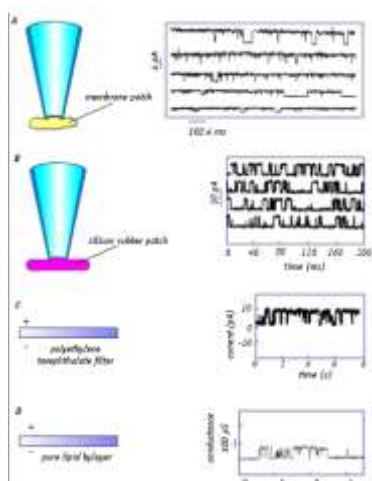


Figura 1.3. Corrientes de “canal único” grabadas en situaciones representadas a la izquierda de cada panel; (A) según Tabcharani *et al.* (1989); (B) según Sachs y Qin (1993); (C) según Lev *et al.* (1993); (D) según Woodbury (1989). Nótese la similitud de los registros experimentales, implicando que las corrientes diferenciadas no están necesariamente vinculadas a rasgos específicos de los canales biológicos.

Este deslumbrante resultado ha revolucionado tanto el campo de la electrofisiología de membrana que a los promotores de la técnica, Erwin Neher y Bert Sakmann, se les otorgó el Premio Nobel. La observación de eventos diferenciados parecería confirmar indudablemente que los iones fluyen a través de canales diferenciados.

Los resultados obtenidos en el laboratorio de Fred Sachs, por el otro lado, nos dejan pensando. Sachs halló que cuando el parche de membrana era reemplazado por un parche de goma de silicona, las corrientes diferenciadas no desaparecieron (Sachs y Qin, 1993); permanecieron esencialmente indistinguibles de las que se midieron cuando la membrana estaba presente (Fig. 1.3 B). Aún más sorprendentemente, la muestra de goma de silicona mostró rasgos de selectividad iónica esencialmente iguales a los del canal de membrana putativo.

Una observación similarmente preocupante fue realizada sobre muestras poliméricas (Lev *et al.*, 1993). Se constató que el flujo de corriente a través de filtros de polímeros sintéticos era diferenciado, precisamente como en la goma siliconada (Fig. 1.3 C). Los filtros también mostraron rasgos comúnmente atribuidos a canales biológicos tales como selectividad iónica, potencial de inversión, y acción de esclusa. Sin embargo, la muestra carecía de cualquier proteína o lípido.

Todavía en otro conjunto de experimentos, un comportamiento tipo canal pudo observarse en membranas de bicapa puramente lipídicas (Woodbury, 1989). Luego de una breve exposición a grandes concentraciones de vesículas lipídicas eyectadas desde la punta de una pipeta distante en aproximadamente 0,5 mm, estas membranas presentaron típicas fluctuaciones parecidas a las de los canales (Fig. 1.3 D). La conductancia cambió en formas usualmente consideradas de ser indicativas de canales de proteína reconstituida – incluyendo cambios en la conductancia en peldaños, parpadeo, selectividad iónica e desactivación. Pero no había ningún canal; las membranas contenían solamente lípido.

¿Qué hemos de hacer con semejantes observaciones? Queda claro a partir de estos tres estudios que las corrientes diferenciadas previamente tomadas como confirmación de la existencia de canales biológicos individuales parecen ser rasgos generales del flujo de corriente a través de pequeñas muestras. Es de suponer que las corrientes surgen a partir de algún rasgo común de estos

especímenes que todavía deberá determinarse, pero evidentemente no a partir de canales individuales ya que están ausentes. Los canales podrían existir –pero la evidencia principal sobre la cual se basa su existencia es mucho menos que concluyente.

Irónicamente, el análisis de la goma siliconada realmente había sido realizado como un control en los estudios de parche-abrazadera originales (Neher *et al.*, 1978). Los autores sí notaron a veces una “conducta contraria” a lo que se esperaba (Pág. 223); pero tal comportamiento fue descartado por haber surgido a partir de irregularidades en la punta de la pipeta. La posibilidad de que pequeñas muestras en general pudieran dar surgimiento a un comportamiento semejante al de un canal aparentemente no fue tomada en cuenta.

Dejando de lado la inquietud arriba mencionada, un segundo punto a considerar es el modo en el que el canal logra su especificidad. Existen canales para cada uno de los iones de la célula; existen canales adicionales para aminoácidos, péptidos, toxinas y azúcares, siendo la mayoría de estos de otra manera incapaces de cruzar la bicapa lipídica; y tal como lo mencioné, también hay canales para el agua. De esta forma, existe una plétora de canales, mayormente maquinados para ser soluto-específicos. ¿Cómo se consigue una especificidad tal?

Para explicar una especificidad tan exquisita, se desarrollaron modelos de alguna complejidad (Hille, 1984; 1992). Un modelo contiene 16 estados de transición diferentes, más sub-estados adicionales. Otro contiene 27 estados. Casi todos los modelos son tan suficientemente complejos que la solución requiere métodos numéricos. De hecho, el cálculo de la trayectoria de una molécula difundiendo a través de un canal durante una ventana temporal de 100 pico segundos es el trabajo de una supercomputadora. Por ende, se requieren modelos de una complejidad desalentadora para la comprensión de la aparente selectividad de los canales. No es un proceso simple.

Aún así, la pregunta inocente persiste: ¿Cómo es que los solutos pequeños no pasan a través de canales grandes? Imaginar cómo uno o dos pequeños iones podrían ser excluidos de un gran canal como resultado de una distribución de campo eléctrico distintiva no es algo muy difícil de visualizar. Este enigma se remonta a la analogía de la puerta para perro (Fig. 1.4). ¿Por qué molestarnos en sumar una puerta para gato, hurón, hámster y gerbo si estos animales podrían acceder fácilmente a través de la puerta para perro? ¿Deberá sumarse alguna especie de repelente para cada especie más pequeña?



Figura 1.4. La analogía de la puerta para canes. La abertura es suficientemente grande como para permitir el paso de todas las especies más pequeñas

La seriedad del problema de tamaño es ilustrada mediante la consideración del ión de hidrógeno. El ión de hidrógeno es de sólo alrededor de 0,5 Å de diámetro (el ión hidratado algo más grande). El orificio del canal de sodio es de

por lo menos 3 – 5 Å de ancho, y los canales específicos para alguno de los solutos más grandes deberán tener un orificio mínimo del orden de los 10 -20 Å. ¿Cómo es posible que un canal de 20 Å pudiese excluir a un ión de hidrógeno diminuto? Es como si un caño de cloaca que deja pasar una pelota de playa pudiera excluir al mismo tiempo pelotitas de golf, así como pelotas de tenis, billar, etc.

Podría decirse, la situación no es tan blanca o negra. Las descripciones de los libros de texto del canal como un tubo hueco simplifican excesivamente la visión contemporánea del canal como un sendero enrevesado; y se piensa que el proceso de selectividad se basa no en el tamaño *per se* sino en alguna interacción compleja entre el campo eléctrico del soluto y los rasgos estructurales del filtro del canal (por ejemplo, Doyle *et al.*, 1998). Además, la selectividad del canal no es absoluta (Hille, 1972). Sin embargo, el asunto de permitir el paso sólo de uno o unos pocos entre un campo de numerosos solutos posibles incluyendo muchos más pequeños queda por tratar de un modo más sistemático. Y el tema de las muestras no biológicas produciendo corrientes de canal individual ciertamente también necesita ser evaluado. ¿Qué implicaría todo esto?

BOMBAS EN REVISIÓN

Como los canales, las bombas vienen en muchas variedades y la mayoría es soluto-específica. La cantidad excede fácilmente a 50. La necesidad de múltiples bombas ya ha sido tratada: a menos que el particionamiento entre el interior y el exterior de la célula esté en equilibrio electroquímico, se requiere el bombeo. Dado que tan pocos solutos están en equilibrio, se necesitan una o más bombas para cada soluto.

La pregunta que surge es, ¿cómo podría la célula bombear un soluto que nunca ha visto? Los antibióticos, por ejemplo, permanecen en una alta concentración afuera de la célula bacteriana pero una baja concentración adentro. El mantenimiento de una baja concentración intracelular implica la necesidad de una bomba y, de hecho, una bomba de tetraciclina para *E. coli* fue propuesta formalmente (Hutchings, 1969). Una situación similar es pertinente para el curare. Dado que el particionamiento de curare en la célula muscular no conforma un equilibrio tipo Donnan, se propuso una bomba de curare (Ehrenpries, 1967). Para arreglárselas con sustancias que nunca vio, la célula parece requerir más y más bombas que las utilizadas regularmente –me reservo la opinión.

¿Cómo es posible esto? Una opción es que las bombas existentes se adapten a estas nuevas sustancias. Pero esto parece ilógico, porque si pudiesen adaptarse tan fácilmente, ¿por qué habrían sido selectivas, para empezar? Una alternativa es que la célula sintetice una nueva bomba cada vez que se topa con una sustancia extraña. Pero esta opción enfrenta el problema de la limitación de espacio: Como el estacionamiento de la universidad, la membrana tiene precisamente tantos espacios disponibles para nuevas bombas (y canales). Dada la habilidad de los químicos en sintetizar una interminable variedad de sustancias químicas –se sumaron 10 millones de nuevas sustancias a la lista de moléculas de la Sociedad Química Norteamericana sólo durante el último cuarto de siglo (New York Times, 22 de febrero de 2000) - ¿cómo podría una membrana ya atestada de bombas y canales alojar todo lo

que se necesitaría eventualmente? ¿Podría una membrana de dimensión finita alojar una cantidad potencialmente infinita de bombas?

Una segunda cuestión es la forma en que la célula reúne la energía necesaria para motorizar la totalidad de sus bombas. ¿De dónde podría provenir todo el ATP? Dado que los iones y otros solutos cruzan la membrana continuamente incluso en el estado de reposo (en teoría debido a aperturas de canales esporádicas), las bombas deben funcionar continuamente para contrarrestar estas fugas. El bombeo no es gratuito. Se estima que sólo la bomba de sodio, sobre la base de mediciones de consumo de oxígeno, consume 45 – 50% del total de abastecimiento energético de la célula (Witham, 1961). Los libros de texto actuales estiman un rango del 30 – 35%.

Para comprobar si hay suficiente energía disponible para motorizar el bombeo, un experimento sumamente conocido fue conducido hace mucho tiempo por Ling (1962). Ling se centró en la bomba de sodio. La idea era exponer la célula a un cóctel de venenos metabólicos incluyendo el iodoacetato y el cianuro, y privarla de oxígeno –todo lo cual deplecionaría a la célula de su provisión de energía y efectivamente le desenchufaría el cable a la bomba. Si estas bombas hubieran sido responsables de mantener los gradientes de sodio y potasio, los gradientes deberían haber colapsado pronto. Pero no lo hicieron. Después de alrededor de ocho horas de exposición al veneno y privación de oxígeno, poco o ningún cambio en el potasio y el sodio celulares fue mensurable.

Ling prosiguió a cuantificar el problema. Calculó la energía residual –el máximo que concebiblemente podría haberse hallado disponible para la célula tras el envenenamiento. Este residual fue comparado con la energía requerida para sostener el gradiente iónico, siendo este último calculable a partir de la tasa de escurrimiento del sodio. Utilizando el más generoso de los supuestos, una estimación conservadora arrojó un déficit de energía de entre 15 y 30 veces (Ling, 1962). Se concluyó que la energía de bomba necesaria para mantener el gradiente observado, en otras palabras, era como mínimo entre 15 y 30 veces mayor que la provisión de energía disponible.

Esta conclusión provocó bastante debate. El debate fue destacado en un artículo de la revista *Science* redactado por la escritora científica hoy muy conocida Gina Kolata (1976), con un tratamiento aparentemente equilibrado que les dio crédito a los argumentos de ambos lados. Kolata citó el trabajo de Jeffrey Freedman y Christopher Miller quienes habían desafiado la conclusión de Ling sobre la magnitud del déficit de energía. La tardía refutación de Ling (1997) es una irresistible “lectura obligatoria” que toma en cuenta no sólo este asunto específico sino también el proceso de la ciencia. El alegato del déficit de energía fue sin embargo puesto a juntar polvo con el advenimiento del aislamiento de la proteína de la bomba –olvidado por todos pero no por un modesto cuadro de investigadores que ha quedado firmemente impresionado por los argumentos (Cf. Tigyi *et al.*, 1991).

Retrospectivamente, ningún debate tan constante respecto de la magnitud del déficit energético de la bomba de sodio parece académico, porque ahora se sabe que las otras numerosas bombas también requieren energía. Además de sodio y potasio, la membrana celular contiene bombas para calcio, cloro, magnesio, hidrógeno, bicarbonato, así como también para aminoácidos, azúcares y otros solutos. Y todavía hay más bombas en las membranas de organelas adentro de la célula: Para que pueda mantenerse el particionamiento

iónico intra-organelas, las organelas tales como la mitocondria y el retículo endoplasmático contienen bombas similares a aquellas contenidas en la membrana superficial. Dado a que característicamente las tasas de filtración son proporcionales al área de superficie, aquí no estamos hablando de cantidades de bombas triviales: las mitocondrias de hepatocitos contienen 20 veces el área de superficie de la membrana de la célula hepática (Lehninger, 1964), y el área del retículo sarcoplásmico del músculo es aproximadamente 50 veces mayor que la de la membrana de la célula muscular (Peachey, 1965). La membrana de tales organelas deberá por ende contener bombas en cantidades por lejos más altas que las de la membrana celular –todas requiriendo energía.

En suma, el bombeo enfrenta obstáculos de espacio y energía. El tamaño de la membrana es fijo pero la cantidad de bombas continuará creciendo inevitablemente. A alguna altura la demanda de espacio podría exceder a la existencia, ¿y entonces qué? El bombeo también requiere energía. Se estima que sólo la bomba Na/K consume una proporción apreciable de la reserva energética de la célula, y esa bomba es una entre muchas más, incluyendo a las de las membranas internas. ¿Cómo se las arreglará la célula con el requerimiento energético relacionado?

¿PODRÍAN JUGAR OTRO ROL LAS PROTEÍNAS DE CANALES Y BOMBAS?

Las secciones anteriores han esbozado ciertos obstáculos que enfrenta el paradigma de bomba-canal. Pero las proteínas exhibiendo un comportamiento semejante al de bombas y canales se han aislado y su existencia necesita ser explicada. ¿Por qué podrían estar presentes si no fuese específicamente para el bombeo y la canalización?

Una hipótesis plausible es que existen para algún propósito diferente. Dada su localización superficial, las proteínas de “bomba” y “canal” podrían disparar una cadena de eventos conducentes en última instancia a la acción en un blanco intracelular. Se sabe que los cambios conformacionales no ocurren solamente en proteínas de bombas y receptores sino también en proteínas de canales (Kölberg, 1994). Si tales cambios llegasen a propagarse hacia el interior, la proteína de la bomba o el canal jugaría en efecto el rol de un receptor.

Un escenario de este tipo no precisa contradecir la clásica acción de “bombeo” y “canalización” de las proteínas: Mientras el cambio conformacional procede, todo ión vinculado se desplazará en el espacio conjuntamente con la proteína (Fig. 1.5). Si la carga vira en contra del gradiente de voltaje, el resultado será interpretado como bombeo; si vira a favor del gradiente se asumirá que el ión ha pasado a través de un canal. Por lo tanto, el bombeo o la canalización serían una inferencia natural, aún a pesar de que el rol funcional de la proteína no es ni el de una bomba ni el de un canal.



Figura 1.5. La translocación de cargas a través de la membrana será registrada como pulsos de corriente.

Un buen ejemplo para ilustrar este tipo de comportamiento es la colicina la, una molécula de toxina que se insinúa hacia adentro de las membranas

bacterianas. Al hacerlo, se piensa que crea un canal que permite el paso de los iones, colapsando de ese modo los gradientes iónicos y matando a la célula. La acción de la proteína está asociada a un cambio conformacional sustancial (Fig. 1.6); alrededor de 50 aminoácidos voltean de un lado al otro de la membrana –conjuntamente con sus iones ligados. Semejante desplazamiento de carga constituiría un pulso de corriente similar a las corrientes descritas en la Figura 1.3; de ahí que la canalización se halla implícita. El que semejante corriente de “canal” medie la función tóxica de la proteína, no obstante, es menos cierto. La toxicidad también podría yacer en la configuración alterada de la proteína, inhibiendo algunos procesos vitales a través de la interacción con proteínas celulares.

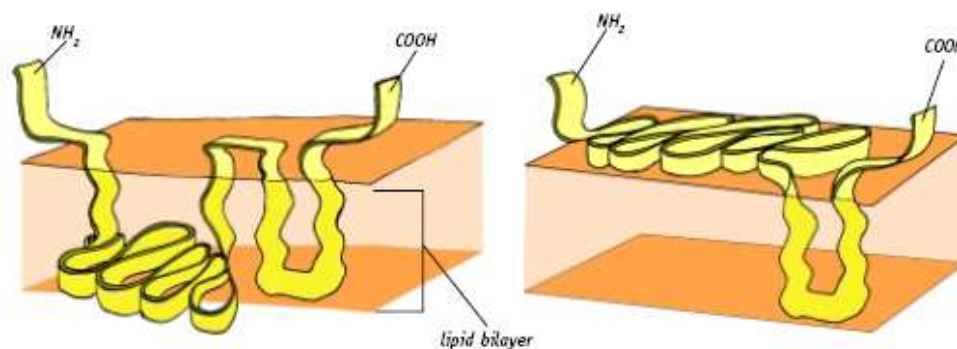


Figura 1.6. Proteína de canal que se abre mediante su translocación desde un lado de la membrana hacia el otro. Fuente: Slatin et al. (1994).

Otro ejemplo es la rodopsina. La rodopsina es una molécula receptora retiniana que sufre un cambio conformacional de modo tal de comunicar por señales la presencia de la luz. La rodopsina existe en otra forma llamada bacteriorodopsina. También impulsada por la energía lumínica absorbida, la bacteriorodopsina puede translocar protones a través de la membrana celular bacteriana. Por ende, la rodopsina es un receptor propulsado por la luz mientras que la bacteriorodopsina supuestamente es una bomba propulsada por la luz. Nuevamente, el movimiento de carga observado en la bacteriorodopsina podría no ser necesariamente el principal evento –la proteína podría funcionar como un receptor de la luz precisamente al igual que la rodopsina lo hace en la retina, disparando una respuesta a través de un cambio conformacional (Lewis *et al.*, 1996). Tal como con la acción de canalización de la colicina la, la acción de bombeo de la bacteriorodopsina podría ser entonces un subproducto incidental, y no necesariamente el evento principal.

Si acaso el bombeo o la canalización observados en tales moléculas podrían tener una significancia funcional dependería de su magnitud: Si la molécula de “bomba” transpusiese relativamente pocos iones, su contribución a la separación iónica celular sería pequeña. Y si el “canal” no consigue llevarse la porción más grande de la torta del tráfico de iones a través de la membrana, éste también jugaría poco o ningún rol en el particionamiento. Incluso pese a ser experimentalmente observables, el bombeo y la canalización mediante estas proteínas continuaría siendo entonces funcionalmente insignificante –en mucho parecido al calor generado por una bombita de luz.

Tal parece, entonces, que el interrogante de esta sección podría ser resoluble. Pese a que los análisis implican que las proteínas bajo consideración pueden “bombear” o “canalizar”, tales procesos podrían ser incidentales al rol funcional principal de las proteínas como receptoras. Las proteínas receptoras están

vinculadas con frecuencia a proteínas de bomba y de canal para así “modular” su actividad; aquí ellas se fusionan en una única unidad cuyos aportes al particionamiento iónico podrían ser totalmente secundarios.

CONCLUSIÓN

En este capítulo se han dado algunos saltos audaces. Empezamos por concedernos la autorización para explorar dos elementos básicos de la biología celular moderna –los canales y las bombas. Mientras repasábamos su origen, encontramos que surgieron como postulados, propuestos para rescatar atractivas teorías que de otro modo habrían colapsado.

El marco rodeando a estos postulados creció luego en complejidad. Los canales y las bombas se multiplicaron desenfrenadamente en cantidad y sus rasgos distintivos se volvieron diabólicamente intrincados. A fin de lograr la selectividad, el canal necesita muchos estados y sub-estados; y se requirió que la bomba se encargue de sustancias que nunca antes había visto. Estas complejidades insinuaron que algo podría estar fallando.

Algunas cosas efectivamente no concordaban, o al menos eran cuestionables. Para los canales fue el liderazgo provisto por los experimentos del parche-abrazadera. Esos experimentos habían sido tomados como prueba de la existencia de canales biológicos diferenciados, pero esa evidencia fue puesta en duda por la demostración de que se podían obtener resultados similares cuando los canales estaban ausentes. También tomamos en cuenta el asunto de la selectividad. No estaba claro cómo el canal podía permitir el paso de un soluto ante todo, mientras excluía sistemáticamente del juego a otros – particularmente a sus integrantes más pequeños (el problema de la puerta para perro).

También se plantearon interrogantes respecto de las bombas. Un tema es la manera en la cual una membrana con un área de superficie finita podía alojar una cantidad de bombas (y canales) continuamente creciente -¿qué ocurre cuando el espacio se termina? Un segundo tema es el irritante asunto del balance de energía: si la provisión energética de la célula es marginalmente adecuada para manejar el bombeo de sodio, ¿Cuáles son los recursos disponibles para motorizar todo el resto de las muchísimas bombas?

A pesar de que el objetivo de este capítulo era empezar a construir un edificio funcional, el reto de encontrar un cimiento fundacional sólido todavía no ha sido cumplido. El fundamento permanece incierto. Tampoco se puede presumir la sensatez de los estratos sub-estructurales, ya que los interrogantes sobre bombas y canales parecen suficientemente profundos para insinuar que los problemas podrían originarse más profundamente.



La Muerte de Marat, 1793, por Jacques Louis David.

CAPÍTULO 2: EL GRUÑIDO DE LA CÉLULA MORIBUNDA

Dado el viraje de eventos en el Capítulo 1, necesitamos preguntar si acaso las incertidumbres terminan allí. Las bombas y canales no emergieron en un vacío. Se originaron a partir de una estructura conceptual consolidada y podría ser que el pecado original yazca en el seno del sistema –en gran manera como en el caso de los epiciclos.

La estructura conceptual en cuestión es la membrana celular. Las bombas llegaron a la existencia cuando se constató que una membrana que se presumía impermeable a los solutos era permeable. Al principio esto fue con un único soluto, luego otro y después con otros adicionales. En lugar de abandonar la noción de impermeabilidad, el tránsito de cada soluto fue adaptado mediante la presunción de otro canal (y bomba). No se tomó en consideración seriamente la posibilidad alternativa –que el sistema conceptual de la barrera continua en sí podría ser erróneo.

Cuando se trata de membranas, reconozco que estamos pisando sobre suelo santificado. El concepto de barrera fosfolipídica continua se ha arraigado tan profundamente en el pensamiento moderno que el mero hecho de ponerlo sobre la mesa para su discusión parece algo semejante a la reconsideración de las virtudes de la maternidad. Sin embargo, como una rama mayor del árbol lógico, el tema no puede ser ignorado.

Para aproximarnos a este asunto, consideramos qué ocurre cuando la membrana es desgajada. Si el particionamiento iónico (Tabla 1.1) requiere una barrera continua, la violación de la barrera debería colapsar estos gradientes críticos. La célula quebrantada debería también perder enzimas y combustible, los procesos metabólicos deberían quebrantarse hasta su detención, y la célula debería ser llevada rápidamente al borde de la muerte. Por el otro lado, si en primer lugar la barrera no fuese continua entonces la disrupción de la membrana podría resultar relativamente inconspicua.

ACTOS DESMEDIDOS

Para desgajar la membrana experimentalmente, los científicos han desarrollado medios pavorosamente similares a aquellos implementados para infringir heridas en seres humanos, es decir, espadas y pistolas celulares. Tales instrumentos no son urdidos por científicos enfurecidos en busca de venganza; están diseñados para escudriñar. Consideremos los tres instrumentos mostrados en la Figura 2.1:

- El *microelectrodo* (o micropipeta) es un cilindro de vidrio templado llenado con una solución de electrolitos. La punta es sumergida dentro de la célula de modo tal de explorar sus propiedades eléctricas. La punta del microelectrodo podría parecer diminuta según estándares convencionales, pero para la célula de 10 μm , la invasión por parte de una sonda de 1 μm no es totalmente disímil a un torso humano siendo empalado por un poste de cerco.
- La *electroporación* es un método de amplia utilización para el taladrado de múltiples orificios en la membrana celular. Los agujeros son creados por el ametrallado de la célula con una descarga de pulsos de alto voltaje, dejando la membrana acribillada con orificios de suficiente amplitud como para el pasaje de genes, proteínas y otras macromoléculas.

- El método del parche-abrazadera involucra desollarle a la célula un parche de membrana de 1 μm para la investigación electrofisiológica.

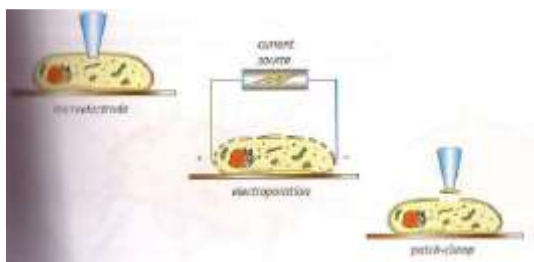


Figura 2.1. Tres métodos para perforar agujeros en la membrana de la célula.

Aunque estas agresiones pueden ocasionar injurias fatales en algunas células, la sorpresa, como vemos luego, es que no son consistentemente consecuenciales.

Consideremos el “clavado” del microelectrodo. El empalamiento no sólo viola la membrana, sino que también destroza las organelas lo suficientemente desafortunadas para situarse a lo largo de la vía de penetración. El previsible oleaje de iones, proteínas y metabolitos podría ser frustrado si el orificio fuese tapado por la espinilla del microelectrodo, pero este puede no ser siempre el caso. Por ejemplo, Stuart Taylor y colegas han utilizado rutinariamente micropipetas para microinyectar tintas sensibles al calcio en múltiples sitios a lo largo de la célula muscular aislada. Lograr esto con una única micropipeta requiere repetidas retiradas que dejan orificios de tamaño micronésimo. Sin embargo, durante hasta varios días luego de la inyección, la célula continúa funcionando normalmente (Taylor *et al.*, 1975).

Los resultados de la remoción del parche son similares. Aquí nuevamente, el orificio en cuestión es groseramente de un tamaño un millón de veces mayor que el ión de potasio. Mis colegas, Guy Vassort y Leslie Tung, quienes rutinariamente realizan estos tipos de experimentos, me cuentan que luego de la remoción del parche de 1 μm , la célula cardíaca aislada de 10 μm frecuentemente seguirá viviendo y continuará latiendo.

Una posible explicación para la supervivencia en todas estas situaciones es que la herida se resella rápidamente. Con la veloz curación, la mortífera oleada de iones podría ser refrenada. Podríamos imaginar que la membrana residual se esparce sobre la zona dañada como la delgada película de jabón se esparce sobre la superficie de agua, cubriendo la herida y así resellando la célula. A través de este mecanismo tipo “curita”, la célula herida podría ser rescatada.

La dificultad con este argumento por demás atractivo es que la membrana no es para nada parecida a la película de jabón. La película de jabón podría tener un espesor de muchas capas, y puede expandirse mediante el adelgazamiento. La membrana es una bicapa de un único lípido –puede esparcirse sólo si las moléculas constitutivas se despliegan. Pero estudios de difracción de rayos X (Korn, 1966) y fluorescencia (Discher *et al.*, 1994) revelan una constante densidad de aparcamiento molecular. Aunque las moléculas pueden difundir en el seno de la bicapa, no pueden separarse apreciablemente sin ocasionar una interrupción de la membrana. Y aunque pudiesen, todavía seguiría siendo necesario encontrar una razón respecto del por qué lo harían: ¿qué podría inducir la extensión de la bicapa?

De hecho, la ausencia de resellado está confirmada por evidencia directa. En el caso de la remoción del microelectrodo, el orificio puede ser visto ya sea mediante observación microscópica directa (Nickels, 1970) o con una claridad incluso mayor si el microelectrodo retirado deja detrás un depósito de sedimento denso en electrones (Nickels, 1970; 1971). El potencial para el resellado también ha sido estudiado en células cortadas. Las células seccionadas no muestran evidencia alguna de resellado, tanto en células musculares (Cameron, 1988) como en axones gigantes (Krause *et al.*, 1994). Ciertamente cambios radicales suceden ulteriormente –la fusión de vesículas exocitóticas podría conducir a algún reabastecimiento de membrana (Bi *et al.*, 1995); y cerca de la herida podría haber una combinación de acumulación de vesículas (Krause *et al.*, 1994), coagulación citoesquelética/vesicular (Fishman *et al.*, 1990; Spira *et al.*, 1993) y acumulación vacuolar (Casademont *et al.*, 1988), pero evidencias micrográficas electrónicas confirman que la herida no es cubierta por una nueva membrana.



Figura 2.2. Sustancias suministradas sustancialmente después del período de electroporación son capaces de ingresar a la célula.

Orificios de largo plazo también están confirmados durante la electroporación. La electroporación es una técnica desarrollada principalmente para transferir moléculas exteriores hacia dentro de las células (Fig. 2.2). Pese a que la permeabilidad puede a veces ser efímera, esto no es necesariamente la norma. Cuando las moléculas son introducidas dentro del baño bien luego del final de la descarga eléctrica, la entrada dentro de la célula todavía es posible. La ventana de oportunidad depende del tamaño molecular. En el caso de moléculas grandes tales como el ADN, se observa una penetración sustancial cuando las moléculas son agregadas desde 20 minutos hasta una hora después de que finaliza el shock (Xie *et al.*, 1990; Klenchin *et al.*, 1991). La albúmina, una proteína extracelular común, también puede penetrar durante aproximadamente una hora (Prausnitz *et al.*, 1994), y para sustancias más pequeñas con una masa molecular en el orden de 1.000 Dalton, el flujo post-electroporación puede suceder por horas y hasta días (Schwister y Deuticke, 1985; Serpersu *et al.*, 1985). Por ende los poros pueden permanecer abiertos por largos períodos durante los cuales pueden pasar sustancias de tamaño miles de veces mayor que el de un ión.

Claramente, entonces, actos despiadados tales como taladrar orificios en la membrana no necesariamente ocasionan estragos dentro de la célula. Los agujeros son enormes en relación al ión. Sin embargo, no hay evidencia de que a la célula realmente le importe. A pesar de estrictos requerimientos de concentración iónica, la célula puede navegar a través de semejantes afrentas casi sin signos de cualquier comportamiento anormal.

Si los ejemplos citados parecen demasiado técnicos, consideremos el comportamiento del alga común *Caulerpa*, una única célula cuya longitud puede alcanzar hasta varios metros. Esta célula gigante contiene tallo, raíces y hojas en una unidad celular indivisa por paredes o membranas internas (Jacobs, 1994). Pese a ser abollada despiadadamente por olas y roída implacablemente por peces hambrientos, a esta célula individual no le importa

una pizca; semejantes rupturas de integridad no amenazan su supervivencia. De hecho, secciones de tallo u hoja deliberadamente cortadas crecerán nuevamente hasta conformar células enteras. El hecho de romper la membrana resulta irrelevante.

Mejor aún, otro ejemplo se halla dentro del área de la genética experimental, donde científicos distinguidos por demás rebanarán brutalmente en dos mitades a inocentes células para así monitorear los destinos de las respectivas fracciones. Cuando células epiteliales en cultivo son seccionadas mediante una filosa micropipeta, la fracción sin núcleo sobrevive durante 1-2 días mientras que la fracción nucleada y conteniendo el centrosoma sobrevive indefinidamente y puede proseguir para generar progenie (Manlotis y Schliwa, 1991). A la célula parece no importarle que acabe de ser rebanada como a un tomate. Células musculares y nerviosas sobreviven similarmente (Yawo y Kuno, 1985; Casademont *et al.*, 1988; Krause *et al.*, 1984).

Luego, está la célula reptante que se parte a si misma en trozos mientras continúa su recorrido hacia adelante (ver Prefacio), dejando por detrás un rastro de fragmentos celulares, lo cual constituye la regla más que la excepción (Chen, 1981). En el caso de las células de fibroblasto, los fragmentos de hasta un 2% del volumen inicial continúan mostrando conductas estándar tales como erizamiento, ampollado, producción de filopodios y evitación del contacto (Albrecht-Buchler, 1980). Los fragmentos permanecen “vivos” durante hasta ocho horas.

Finalmente, y quizás nada sorprendentemente a la luz de todo lo que se ha dicho, las células mamíferas comunes se hallan continuamente en un estado “herido”. Las células que sufren abrasión mecánica tales como las células cutáneas, las células endoteliales intestinales y las células musculares se hallan particularmente expuestas a las heridas –como lo confirma el ingreso a la célula de grandes marcadores que comúnmente no pueden entrar, tales como la albúmina sérica, la peroxidasa del rábano picante y el dextrano (peso molecular de 10.000). Las células así heridas se presentan por lo demás estructural y funcionalmente normales (McNeil e Ito, 1990; McNeil y Steinhardt, 1998). El porcentaje de células heridas en diferentes tejidos es variable (Tabla 2.1). En células musculares cardíacas este es de un ~20%, pero bajo estimulación por isoproterenol la fracción se eleva hasta un 60% (Clarcke *et al.*, 1995). Por ende, las roturas en la membrana celular no son ni exóticas ni arcanas; ellas ocurren como un evento común en el tejido normal y fisiológicamente funcional.

Tabla 2.1. Herida de células bajo condiciones fisiológicas (de McNeil y Steinhardt, 1977)

Órgano	Tipos celulares	Porcentaje de células heridas
Músculo esquelético	Células de músculo esquelético	5-30
Piel	Células epidérmicas	3-6
Tracto gastrointestinal	Células epiteliales	-
Músculo cardíaco	Miocitos cardíacos	20
Aorta	Célula endotelial	6-5
Oído interno	Células de cabello auditivo	-

Al parecer estamos atrapados en los vericuetos de un dilema. Si insistimos en que una barrera continua envuelve a la célula, necesitamos reconciliar la serie de observaciones anteriormente mencionada y necesitamos explicar por qué la apertura de brechas en la barrera no resulta más consecuencial de lo que parece ser. El anticipado colapso de gradientes iónicos debería destruir rápidamente las proteínas celulares (Choi, 1988; Berridge, 1994). Por el otro lado, si coincidimos en que la barrera podría no ser continua, por lo cual crear todavía otra abertura más no difiere en mucho, nos enfrentamos entonces a un obstáculo de naturaleza diferente. Desafiamos al dogma prolongadamente validado de la barrera continua, como asimismo a la evidencia sobre la cual presumiblemente está basado el concepto de la barrera continua.

¿Precisamente cuán fuerte es tal evidencia?

CONTINUIDAD DE MEMBRANA

El concepto de membrana fosfolipídica continua surgió durante la era de la microscopía óptica lumínica. Dado que los microscopios de luz comunes no pueden determinar estructuras en el orden de los 10 nm, aquello que fue identificado como una membrana probablemente fue la densa capa citoesquelética subyacente, la cual es 100 veces más gruesa. El citoesqueleto es un tema significativo al cual se le dedicará una atención considerable (Capítulo 10). El hecho de que éste pueda parecer continuo en el microscopio de luz nada denota respecto de una continuidad a escala molecular –o si en realidad la bicapa lipídica oculta pudiese ser continua.

Con el transcurso del tiempo, el concepto de membrana fosfolipídica continua, sin embargo, obtuvo un amplio apoyo. Colecciones de lípidos formaban vesículas esféricas que parecían análogas a membranas celulares. La microscopía electrónica reveló que la periferia celular poseía una estructura característicamente trilaminar que se dedujo que correspondía a la bicapa lipídica. E imágenes de congelamiento-fractura mostraron vistas llamativas de las caras de la membrana. Aquello que en un comienzo se había inferido a partir del microscopio de luz no se parecía en nada a lo confirmado mediante estos métodos.

Simultáneamente, estaba tornándose claro que la membrana celular no era de modo alguno sólo fosfolipídica. Con el aislamiento de las proteínas de membrana, se supo que el contenido proteico de la membrana era apreciable. La estimación para membranas típicas en los libros de texto vigentes se halla en el orden del 50%. En las membranas más internas de mitocondrias y cloroplastos, la relación entre los pesos de proteína y lípido se eleva hasta 3:1, y en ciertas membranas bacterianas la relación es tan alta como 4:1 o 5:1 (Korn, 1966, Tabla 1). Por ende, la popular idea de una bicapa lipídica tachonada con proteínas ocasionales es engañosa. La membrana genérica es mucho más una estructura proteica con inclusiones lipídicas que una estructura lipídica con inclusiones de proteína. Ver Figura 2.3.

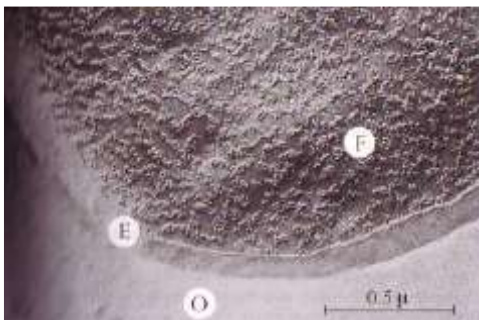


Figura 2.3. Disposición de proteínas en la membrana celular. Este glóbulo rojo fue congelado rápidamente, y luego fracturado para su preparación para microscopía electrónica. La superficie fracturada (F) revela muchas partículas de las cuales se pensaba eran proteínas de membrana. La región fina (E) revela la superficie exterior de la célula, mientras que la región (O) está afuera de la zona fracturada. Según Pinto da Silva y Branton (1970).

Para algunos, esta revelación puede constituir una sorpresa. La idea de una membrana fosfolipídica continua se halla tan profundamente arraigada en el pensamiento vigente que resulta difícil el asimilar el hecho de que las membranas pueden constar con un 50%-80% de proteína. Me aventuro a decir que si la proteína hubiese sido identificada antes que el lípido, la rúbrica de una membrana proteica podría haber sido adoptada en lugar de la de membrana lipídica.

Pero la membrana de “proteína” exige el cuestionamiento de la continuidad. Las proteínas de membrana son típicamente grandes moléculas que se pliegan sobre sí mismas muchas veces mientras fluyen a través de la membrana. Las hendiduras resultantes crean vías de flujo naturales como rajaduras en el concreto, a través de las cuales pueden filtrar el agua y los iones. Estas proteínas impactan asimismo en las moléculas lipídicas de membrana, alterando su disposición natural y creando vías adicionales para el flujo iónico (Heimburg y Biltonen, 1996). En realidad, resulta difícil encontrar cualquier informe respecto de una proteína clavada dentro de una membrana modelo que no aumente la permeabilidad.

Dado el resquebrajamiento de la membrana con predominio proteico, vale la pena reflexionar sobre cómo algunas observaciones bastante conocidas que habían parecido anómalas ahora podrían conciliar.

El primero es un viejo experimento realizado por un otrora prominente fisiólogo quien estudió el flujo de potasio transmembrana (Solomon, 1960). El flujo fue medido bajo condiciones controladas y bajo condiciones en las cuales los lípidos de membrana fueron parcialmente quitados. El flujo de potasio fue el mismo –no dependió de que los lípidos permaneciesen intactos. La ausencia de impacto fisiológico condujo al autor a cuestionar si acaso la membrana es “superflua para el mantenimiento de la integridad celular y de la función intracelular”.

Otra observación sumamente conocida es sobre el flujo de agua transmembrana. El intercambio de agua a través de una bicapa lipídica es extremadamente lento. El intercambio a través de la frontera celular es de cómo mínimo un orden de magnitud más rápido, y este exceso ha sido explicado mediante la invocación de canales de agua especializados que penetran la bicapa. (Dempster *et al.*, 1992). Pero los canales de agua son superfluos dentro del marco de la barrera discontinua; el agua puede intercambiar naturalmente en el contexto de la hidratación proteica (Capítulo 4).

Otra observación más fácil de reconciliar con la membrana de predominio proteico es un cambio del área de superficie celular. En respuesta a un desafío osmótico agudo, una duplicación del área de superficie de membrana no es inusual en algunas células. La forma en que un cambio semejante podría ser

complacido por una membrana no ha sido clarificada, dado que el embalaje molecular no sufre ningún cambio mensurable en la bicapa lipídica cuando la membrana es forzada hasta el límite de la fractura (Discher *et al.*, 1994). En una membrana repleta de proteínas enrevesadas en forma de acordeón, por el otro lado, la adecuación de semejante cambio en el área de superficie es todo un tema; las proteínas simplemente se despliegan (Fig. 2.4).

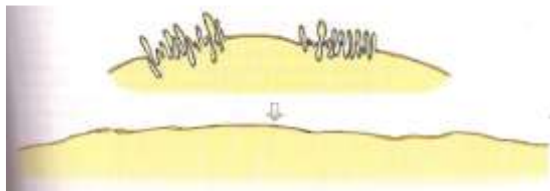


Figura 2.4. Despliegado de proteína con incremento en el área de superficie de membrana.

Mientras que estas explicaciones pueden tener sentido, uno se queda con un sentimiento intranquilo de haber visto micrografías electrónicas mostrando una membrana continua rodeando a la célula. ¿Puede ser ignorada semejante evidencia? Estamos condicionados a interpretar como fosfolipídica la frontera trilaminar que circunscribe a la célula. Sin embargo, cuando todo el lípido en las membranas mitocondriales es disuelto mediante tratamiento con acetona, el límite persiste (Fleischer *et al.*, 1965). Y membranas de *E. Coli B* poseen una estructura trilaminar incluso a pesar de que no contienen esencialmente ningún ácido graso insaturado –comúnmente un componente lipídico fundamental de la membrana (van Iterson, 1965). En virtud de estos hechos, uno debe imaginar si acaso la estructura trilaminar vista en el microscopio electrónico puede realmente representar a la membrana fosfolipídica, o si en lugar de ello ésta representa algún rasgo distintivo celular-interfacial realzado por el procedimiento de tinción.

Este tema recibe mucha atención en una revisión de Hillman (1994). Una de varias cuestiones planteadas por Hillman es por qué los límites celulares trilaminares observados en las micrografías electrónicas no están repletos de proteínas de canal, bomba o receptor. Nominalmente de un tamaño entre 20 y 30 nm, tales proteínas son más grandes que la frontera trilaminar de 10 nm, y si son tan abundantes como se anticipó, estas proteínas deberían divisarse ya sea como manchas teñidas, o si no absorben la tinción, como brechas. No obstante ello la frontera tri-laminar es casi siempre ininterrumpida. ¿Qué puede significar esto?

Finalmente, si la membrana no funciona como una barrera iónica continua, uno tendría derecho a preguntar por qué en principio debería estar allí. Puedo concebir por lo menos tres roles posibles (Capítulo 16): un andamio dentro del cual las proteínas de membrana se hallan insertadas; una barrera parcial para retardar la pérdida de proteínas solubles y metabolitos desde la célula; y un deflector del flujo iónico transmembrana hacia aquellas regiones (proteicas) donde una útil acción disparadora puede suceder.

En resumen, la visión de que la célula está rodeada por una barrera iónica continua no parece hallarse bien sustanciada. La membrana está dominada por proteínas y glicoproteínas, las cuales son capaces de intercambiar agua, sales y otros solutos pequeños. La barrera está resquebrajada. El resquebrajamiento podría explicar la documentada difusión pasiva hacia el interior celulares de péptidos de un tamaño < 100 aminoácidos (Lindgren *et al.*, 2000). Espero que esta conclusión no sea malinterpretada como implicando que la membrana no es importante, o de que no hay membrana. La célula evidentemente sí tiene

una membrana –es sólo que el rol de esta organela podría ser diferente al que se le atribuye comúnmente.

CONCLUSIÓN

Prosiguiendo intrépidamente, en este capítulo nos propusimos reconsiderar la noción de la barrera iónica continua. Si la barrera fuese continua, razonamos, violar su continuidad mediante el rasgado de grandes agujeros debería permitir que los iones salgan en tropel a través de la frontera celular y que los solutos se filtren hacia afuera, alterando dramáticamente la conformación de la célula, interrumpiendo la función celular y, eventualmente, matando la célula.

Pero eso no ocurrió. Ya sea creadas por el clavado dentro de la célula de una micropipeta, el punteado de un parche de la membrana, el acribillado de la membrana con una descarga eléctrica, o el rebanado de la célula en dos, las heridas parecieron importar muy poco, la célula pudo a menudo continuar funcionando como si no hubiese sucedido violación alguna. Fue como si la función pudiese ser sostenida solamente por el citoplasma.

Para obtener una mejor perspectiva respecto de este resultado inquietante consideramos la evidencia concebida como subyacente a la presuntiva continuidad de la barrera y constatamos que es todo menos certera. Notamos que la bicapa lipídica contenía proteínas en abundancia, lo cual confiere el resquebrajamiento a la membrana. Con una naturaleza resquebrajada, uno puede racionalizar sobre por qué pinchar otro orificio podría no importar mucho.

El paradigma de la membrana resquebrajada también brinda un entendimiento para con las dificultades con los canales y las bombas. Estos elementos surgieron para proveer las vías necesarias para que los iones fluyan a través de una membrana que se presumía era impermeable. Con la permeabilidad, tales elementos se tornaron redundantes. El motivo por el cual su imputada función podría parecer discordante con la evidencia resulta comprensible.

Quizás se está tornando claro que la excavación hacia el núcleo de la verdad requiere el descamado de múltiples capas de supuestos. Todavía no llegamos allí. El próximo capítulo considera una capa de supuesto aún más fundamental que aquellos ya tratados –el supuesto que condujo a la noción de barrera continua en primer lugar. ¿Por qué fue necesario postular una barrera continua?



Mujer IV, 1952-1953, por Willem de Kooning

CAPÍTULO 3: MALESTAR CITOPLASMÁTICO

Hasta ahora nuestra atención había estado enfocada en la membrana celular y sus componentes. Los temas de la separación iónica han sido tratados en términos de bombas y canales de membrana, y las cuestiones sobre bombas y canales han sido tratadas en términos del concepto de barrera continua. Aquí extendemos esta cadena. Preguntamos si las cuestiones sobre la barrera continua pueden surgir a partir de algo aún más fundamental –la naturaleza del citoplasma cercado.

¿Cómo fue que el concepto de membrana-barrera cobró existencia en primer lugar? Recordemos que la barrera surgió como un postulado del siglo XIX insinuado para explicar por qué las sustancias en el seno de la célula no se mezclarían libremente con el medio circundante. ¿Si no fuese por la presencia de una barrera membranosa, cómo podría la célula mantenerse definida? La lógica de este argumento es difícil de criticar, pero la premisa subyacente necesita ser reconocida. La premisa es que la mayoría de sustancias dentro de la célula pueden difundir libremente; de lo contrario, ¿por qué molestarse en postular una barrera? El concepto de barrera, en otras palabras, surgió a partir de la presunción de que los constituyentes citoplasmáticos se hallan efectivamente disueltos en una solución acuosa salina y pueden difundir libremente.

¿Cómo podría ser de otra manera? A esta altura una alternativa racional podría ser difícil de imaginar pero hacia el final de unos pocos capítulos yo esperaré que surja una alternativa clara, natural –y posiblemente incluso correcta. La alternativa pone a las superficies proteicas en el centro del escenario, ordenando las moléculas de agua cercanas hacia un estado “estructurado” y proveyendo sitios de adsorción para los solutos cargados. La matriz de proteína-ión-agua resultante posee un carácter parecido al gel muy diferente a la liquidez de una solución acuosa. Pese a que semejantes atributos puedan no ser familiares para los biólogos clásicamente entrenados, son explotados regularmente por químicos e ingenieros para el diseño de dispositivos prácticos (Capítulo 8).

Al considerar la naturaleza del citoplasma, pensemos en el familiar huevo (Fig. 3.1). Seguramente ustedes han partido y abierto un huevo crudo –¿lo caracterizarían como una solución acuosa? ¿O la clara de huevo fresca es más bien de naturaleza gelatinosa?

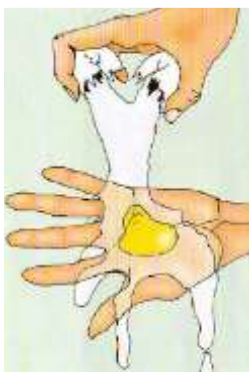


Figura 3.1. El citoplasma se parece a un gel.

Para aprehender más rigurosamente la naturaleza del citoplasma, consideramos sus rasgos distintivos físicos. Si el citoplasma fuese una solución

acuosa, entonces el agua y los solutos deberían comportarse de forma predeciblemente convencional. Si el citoplasma es gelatinoso, estos constituyentes se comportarán diferentemente. La distinción es significativa, porque si ocurriese que los solutos no pudieran difundir libremente, esto haría obvia la necesidad de una barrera continua.

Por ende, examinamos el comportamiento del agua celular, y luego el de sus iones.

EL GRAN ESCALOFRÍO

En Seattle, donde afortunadamente vivo, las temperaturas raramente se zambullen por debajo del punto de congelamiento pero en alguna ocasional noche invernal pueden descender tanto como hasta los 15°C bajo cero. A semejantes temperaturas algún rododendro aquí y allá morirá y otros pocos pueden exhibir daños foliares, pero principalmente, estas robustas plantas sobreviven incluso el más frío de los inviernos sin ningún contratiempo.

Para poder sobrevivir, las plantas (o los animales) no pueden congelarse. Esto es, el agua dentro de la célula no puede convertirse en hielo, ya que los cristales de hielo rasgarían despiadadamente a través de las células y causarían estragos en cualquier estructura que pueda interponerse en su camino de crecimiento. La fuerza de la cristalización del hielo es sorprendentemente alta. El estanque de mi jardín, por ejemplo, se congelará ocasionalmente, y cuando se anticipa un clima frío, la práctica común es dejar flotando una gruesa tabla de madera sobre la superficie del agua para así absorber el impacto del hielo cristalizando. De otro modo, la pared de concreto del estanque puede ser rajada por la fuerza del crecimiento del hielo.

Los estragos de la formación de cristales de hielo también son bien conocidos por quienes se hallan involucrados en el congelamiento de células para su análisis mediante microscopía electrónica. Cuando el congelamiento es alcanzable en una escala temporal de microsegundos, como a menudo suele ser el caso a nivel de la superficie del espécimen, la estructura proteica local resulta en gran parte no afectada porque el hielo cristalino usual no se forma. Más profundamente dentro de la muestra, donde el tiempo de congelamiento se enlentece hasta llegar a milisegundos, incluso los dispositivos de congelación ultra-rápida más sofisticados no pueden impedir la formación de cristales de hielo. Allí donde en efecto se forman tales cristales de hielo, la matriz proteica es destruida, a veces más allá de un posible reconocimiento. Para la supervivencia, el congelamiento del agua de la célula (aunque no necesariamente el del agua en el exterior de la célula) debe ser evitado a toda costa.

La defensa de la Naturaleza contra el gran enfriamiento es bajar la temperatura a la cual la célula se congela. Dado que la célula está rellena con solutos, el agua celular no se congelará a 0°C sino a una temperatura algo inferior. El principio es el mismo que el derretimiento del hielo provocado por el espolvoreado de sal: la sal reduce la temperatura de congelamiento en virtud de las propiedades coligativas de la solución. Para la célula, sin embargo, el descenso máximo que puede lograrse a través de esta vía es sólo de alrededor de 2°C (de Vries, 1982). Por lo tanto, a -15°C el rododendro debería congelarse fácilmente inclusive si algo de calor es generado por procesos metabólicos enlentecidos. Y a -30°C, una temperatura no tan infrecuente en climas

extremos, las plantas y los animales de sangre fría deberían expirar sin rechistar. Cuan notable resulta el hecho de que en el alto Ártico, insectos tales como la oruga del oso lanudo sobrevive a temperaturas que se zambullen consistentemente por debajo de los -50°C .

Algo evidentemente no concuerda. Si el agua celular es en algo parecida al agua de mi estanque, aun con solutos disueltos en una alta concentración el agua debería congelarse a temperaturas no lejanamente por debajo de 0°C – pero no lo hace. A medida que la temperatura desciende, las moléculas de agua de la célula son impedidas de entrar en la característica configuración de cristal de hielo; son, de algún modo, mantenidas cautivas. La forma en que son cautivadas se tratará en el Capítulo 4. Por el momento el resultado final es que hay algo del agua celular que parece diferir respecto del agua suelta.

Dada esta diferencia, surge el interrogante sobre la forma en que los solutos podrían ser impactados. ¿Los iones en semejante agua “incongelable” son tan difusibles como lo son en una solución acuosa común? ¿O se hallan restringidos?

DIFUSIBILIDAD IÓNICA

Propulsados por fuerzas térmicas, los iones en solución acuosa usual sufrirán movimientos aleatorios continuos. Como la pizca de sal arrojada dentro de la sopa de pollo, las moléculas se esparcirán de modo tal de erradicar cualquier gradiente de concentración. La distribución de las moléculas será, por norma, uniforme.

La mayoría de normas tiene excepciones y dos de estas deberían ser apuntadas por su relevancia. Primero, los compartimientos internos de la célula tales como las mitocondrias y el retículo endoplasmático tienden a acumular iones; en el interior de tales organelas los iones pueden estar altamente concentrados. Segundo, las superficies cargadas de las proteínas pueden similarmente atraer y concentrar iones. Remotamente desde tales estructuras, sin embargo, la expectativa de una libre difusibilidad implica una distribución iónica citoplasmática uniforme.

Para investigar tal uniformidad, varios métodos son empleados comúnmente. En un método, los iones son marcados radiactivamente y su distribución es detectada sobre una película sensible. Un segundo método utiliza el microscopio electrónico para mapear la distribución de iones o sucedáneos iónicos detectables. Un tercer método involucra el uso del microanálisis de rayos X de muestras por congelación rápida para establecer la distribución elemental. Con estos métodos resulta posible analizar si los iones celulares se hallan o no distribuidos uniformemente.

El tipo de célula más utilizado para este tipo de estudio es el músculo esquelético (Fig. 3.2). Por ser esta organización interna de la célula predeciblemente regular, resulta fácil correlacionar la distribución iónica con la estructura. La maquinaria contráctil del músculo esquelético consiste en un conjunto paralelo de hebras llamadas miofibrillas, cada una circundada por un retículo semejante a un tejido de malla. El conjunto de proteínas regularmente repetitivo a lo largo de la miofibrilla genera el característico patrón de acuatillado, las bandas A (oscuras) y las bandas I (claras).

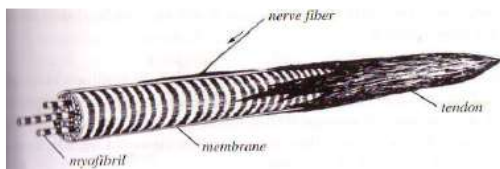


Figura 3.2. Estructura esencial de una célula de músculo esquelético.

La distribución de iones entre bandas ha sido mapeada, con resultados consistentes entre todos los métodos arriba mencionados (Edelmann, 1988). Es decir, la cantidad de iones de potasio y sodio es mayor en la banda A que en la banda I. Lo paradójico es que el volumen de la banda A contiene más proteína y por ende menos espacio para el solvente. Así, la mayor cantidad de iones en el volumen más pequeño se traduce en una disparidad de concentración aún mayor. Con el método micro-analítico, la diferencia de concentración A/I es del orden de dos veces, y algunos de los otros métodos reportan valores mayores. Estos gradientes persisten indefinidamente.

Un segundo nivel de organización en el cual se puede constatar la presencia de gradientes se halla entre el interior y el exterior de la miofibrilla – nuevamente a una escala de $\sim 1 \mu$. Bajo condiciones fisiológicas, la concentración promedio de potasio es aproximadamente un 50% más alta dentro de la miofibrilla que en el espacio rodeando la miofibrilla (Stephenson, 1981).

Un tercer nivel de distinción se halla en la zona justo por dentro de la membrana celular. La distribución iónica en el seno de esta zona fue estudiada en células de músculo cardíaco usando el microanálisis de rayos X (Wendt-Gallitelli *et al.*, 1993). La concentración de sodio fue siempre más alta en la cercanía de la membrana y decreció hacia el interior de la célula. El gradiente fue más pronunciado cuando la célula se hallaba en su estado activado con una concentración de sodio justo por dentro de la membrana de 40 mM versus 17 mM al alejarnos unos 200 nm. La evidencia de un gradiente permaneció durante hasta 3 minutos luego de haber cesado la estimulación –por lejos más prolongadamente que los milisegundos predichos a partir de la teoría de la difusión común.

En adición a los gradientes de sodio y potasio existe evidencia respecto de gradientes sostenidos de calcio. Con pulsos de estímulos de larga duración aplicados a células musculares esqueléticas, la región celular más cercana al ánodo del estimulador se vuelve deficiente en calcio y la deficiencia persiste durante todo el lapso de persistencia de la sucesión de estímulos (Trube *et al.*, 1981). Los gradientes también se observan en vistas de sección cruzada de fibras activadas, con “hot-spots” conteniendo hasta 100-200 veces más calcio que varios micrómetros más lejos (Rozycka *et al.*, 1993). Estos puntos álgidos no se desvanecen con el tiempo pese a que podrían gradualmente cambiar de sitio en el espacio. Por ende, el calcio se halla distribuido no-uniformemente, al igual que el sodio y el potasio. Los gradientes iónicos sostenidos también son característicos de las células cardíacas, donde una revisión comprehensiva concluyó que la no-uniformidad espacial es la norma más que la excepción (Carmeliet, 1992).

Los gradientes locales tienen sentido porque toman en cuenta una compartimentación funcional. Consideremos el calcio. Este ion activa virtualmente la totalidad de los numerosos procesos de la célula (Alberts *et al.*, 1994). Si el calcio llegase a inundar la célula uniformemente, todos los procesos serían activados simultáneamente; cada vez que la célula se activara

para secretarlo también recibiría la señal para dividirse. Evidentemente, un escenario de este tipo tiene poco sentido –los procesos necesitan ser activados selectivamente, y esto es posible sólo porque la célula es capaz de sostener los empinados gradientes de calcio. Una temática similar es aplicable para el potasio. Una alta concentración de potasio es requerida para la función de ciertas enzimas, bajo potasio para otras (Stryer, 1988). Con una concentración de potasio uniforme, sólo una fracción de las enzimas de la célula podrían operar al mismo tiempo. Los gradientes de concentración locales posibilitan un control local selectivo de la función enzimática.

Pero yo digresiono. El punto principal no es tanto que los gradientes impidan que la célula llegue a trastornarse sino meramente que estos existen. Los iones en zonas contiguas son mantenidos a concentraciones dispares. Evidentemente estos iones no pueden difundir libremente, porque si lo pudiesen hacer, los gradientes desaparecerían rápidamente. Algo refrena a los iones.

DIFUSIBILIDAD GLOBAL

La difusibilidad también puede ser confirmada en una escala global. En la sección previa consideramos la difusión entre micro-regiones contiguas dentro de la célula. Aquí consideramos si acaso los iones poseen la capacidad para difundir hacia adentro o afuera de la célula.

Al investigar la difusión trans-frontera, cualquier incertidumbre persistente respecto del efecto de una barrera membranosa puede ser erradicada mediante la simple remoción de la membrana; los iones deberían entonces hallarse perfectamente libres para pasar a través de la frontera si estos pueden difundir. Por ejemplo, si la célula sin membrana es puesta en un baño con bajo potasio, los iones de potasio concentrados dentro de la célula deberían inmediatamente fluir hacia fuera para erradicar el gradiente de concentración.

Precisamente fue éste el experimento ejecutado hábilmente por Kellermayer *et al.* (1986). Kellermayer pre-cargó células con potasio radiactivamente marcado y examinó cuán rápidamente los iones marcados abandonaron la célula una vez que la membrana había sido desbaratada (Fig. 3.3). Los orificios en la membrana fueron creados mediante la exposición a un detergente. Con el detergente Brij 58, la microscopía electrónica confirmó que la membrana contenía enormes agujeros dentro de los dos minutos; pero el potasio no comenzó a fluir apreciablemente hacia fuera de la célula hasta los cinco a seis minutos. Y cuando en efecto éste finalmente fluyó seriamente, el potasio vino en un gran bolo, junto con las proteínas de la célula.



Figura 3.3. La disrupción de la membrana no conduce a una inmediata liberación de potasio.

Una repetición más reciente de este experimento con otro tipo de célula arrojó resultados todavía más dramáticos (Cameron *et al.*, 1996). Con células de lente ocular, la completa pérdida del potasio requirió más de ocho horas luego de la disrupción de la membrana. La escala de tiempo para la pérdida de proteína fue similar, y otros iones (sodio, calcio, magnesio) fluyeron casi tan lentamente. Sin embargo, la presencia de grandes orificios en la membrana pudo ser documentada apenas transcurridos unos pocos minutos luego de la exposición al detergente.

Estos resultados dicen mucho. El marco experimental es análogo a una represa en la cual se ha volado un enorme agujero. Una vez que la integridad de la represa es violada, el agua debería fluir inmediatamente. Si el flujo no comienza de inmediato, nos vemos forzados a reconsiderar qué podría estar pasando. Por ejemplo, el agua superficial podría estar congelada, o restringida por algún otro motivo.

Similarmente para la célula, dado que el flujo de potasio no comienza inmediatamente después que aparecen los orificios, inferimos que la difusión se halla restringida debido a algún rasgo distintivo del citoplasma. El rasgo podría estar relacionado con el agua del citoplasma, la cual se dedujo que es diferente al agua común; o, podría hallarse relacionado con las proteínas, las cuales filtraron conjuntamente con los iones. La restricción vinculada a la proteína se halla implícita en los persistentes gradientes de concentración observados entre las bandas A e I: las proteínas de las bandas A podrían de algún modo coaccionar a los iones y restringir su difusión hacia dentro de la banda I (Cf. Capítulo 6).

Cualquier ceñimiento de este tipo no debería sorprendernos: si no es una barrera membranosa la responsable del particionamiento iónico, debería serlo otra cosa. La adsorción iónica a superficies de proteína es un fenómeno que será tratado en detalle en varios de los próximos capítulos.

CONCLUSIÓN

El huevo crudo no fue un engaño –el citoplasma no es la solución acuosa que sentenciosamente se le atribuye ser. A pesar de que el agua común se congela a 0°C, el agua celular no lo hace. Aún tras la justificación de que el descenso de la temperatura de congelamiento surge a partir de la presencia de partículas disueltas, el agua celular todavía debería congelarse apenas por debajo de 0°C, pero se requieren temperaturas por lejos más bajas. El agua del

citoplasma se comporta anómalamente –de algún modo u otro la entrada de las moléculas al estado de hielo es reprimida. Algo las contiene.

Una limitación similar parece mantener controlados a los iones. Pese a que se sabe que los iones en células activadas difunden fácilmente, en la célula inactivada, la restricción se cumple tanto a una escala microscópica como también a una escala global donde los iones se niegan tenazmente a difundir a través de la frontera celular abierta. Las proteínas tampoco difunden hacia fuera con facilidad (Clegg y Jackson, 1988). Los gradientes sostenidos no son compatibles con la idea de la libre difusibilidad; los iones son de algún modo limitados, tal como el agua.

El encanto de estas observaciones radica en que ayudan a resolver el interrogante de este capítulo. Si los iones se hallan restringidos, el fantasma de iones y otros solutos difundiendo a través de los portales de la membrana celular agujereada y obliterando los gradientes de concentración críticos ya no constituye una preocupación. Con la restricción, los iones permanecerán colocados en su lugar.

PERSPECTIVA

Como esta primera sección del libro se acerca a su fin parece apropiado reflexionar sobre dónde hemos llegado. El objetivo era abordar un núcleo de certidumbre mediante la penetración por debajo de las capas de lo “generalmente aceptado”. Se fueron descamando sucesivas capas de supuestos. El proceso ha confirmado ampliamente aquello que debería haber sido obvio desde el principio: los supuestos son las semillas que estrangulan las flores de la verdad.

El proceso comenzó con la cuestión del particionamiento iónico, un rasgo distintivo que se supuso se basaba en el bombeo y el canalizado. Pese a que las proteínas de “bomba” y de “canal” existen claramente, se constató que el concepto de separación iónica fisiológica mediante el bombeo y el canalizado es ilógico y no concuerda con cierta evidencia básica.

Fue así que nos dimos cuenta que el paradigma bomba-canal se erigió a partir de un supuesto subyacente –la célula está envuelta por una barrera impermeable a los iones. Sin embargo hallamos que cualquier barrera parecida deberá ser agujereada, ya que la membrana contiene entre un 50 y un 80% de proteína lo cual provee amplios senderos para el escape. Esto ayudó a explicar por qué el rebanar la célula pudo ser tan inocuo –el rebanado meramente incrementó la cantidad de caminos de flujo, y no cualquier cosa más fundamental.

Entonces nos dimos cuenta que el paradigma de la barrera impermeable también estaba basado en un supuesto subyacente. El supuesto aquí fue que los iones del citoplasma podían difundir libremente, pero experimentos simples mostraron que los iones citoplasmáticos se hallaban limitados.

Lo que hemos desenterrado, entonces, es una serie de supuestos anidada. Desde el fondo hacia arriba: la libre difusibilidad engendró la barrera membranosa continua; la barrera continua engendró las bombas y los canales; y las bombas y los canales engendraron el proceso de separación iónica

aceptado. Una cadena de ilegitimidad, si lo prefieren, comenzó con el pecado original de la libre difusibilidad (Fig. 3.4).

Esta cadena de duda subyace a toda la biología celular moderna. No veo ningún camino para eludirlo. Los paradigmas biológicos de la célula se apoyan sobre un basamento de endeble supuestos. El motivo por el que estos paradigmas se han vuelto desconcertadamente complejos no es difícil de descifrar, porque los paradigmas simples raramente emergen a partir de cimientos poco sólidos –aprendimos eso de los epiciclos.

La conclusión que sacamos aquí es obviamente no convencional, y antes de avanzar algo más lejos yo los urgiría a retroceder y reflexionar sobre si yo habría podido embaucarlos. Un buen lugar para empezar es con uno de los textos estándar de este campo tales como el impresionante trabajo de Alberts y colaboradores (1994). Estudios oficiales de este tipo ofrecen un contrapunto para lo que he venido presentando y deberían permitirles realizar un juzgamiento informado respecto del mérito del mensaje de este libro.

A esta altura me gustaría insinuar que hemos avanzado bastante lejos a lo largo de la línea de enfoque vigente. Habiendo penetrado a través de capas de engendros presuntivos, hemos adquirido la suficiente dirección como para detectar que el encuentro con la verdad no debería estar muy lejano –no deberíamos necesitar engendrarnos en reversa hacia Adán y Eva.

El equilibrio que buscamos edificar es armado en los próximos varios capítulos del libro. Allí dejamos de lado el equipo de construcción estándar de lo “generalmente aceptado” y empleamos los ladrillos y el mortero de la química elemental y la física para deducir cómo interactúan las proteínas, los iones y el agua. Una vez alcanzado este hito deberíamos hallarnos en una posición sensata para el lanzamiento de la exploración de la dinámica celular –la forma en la que la célula lleva a cabo sus tareas funcionales. Y eso, les prometo, es donde la diversión empieza.

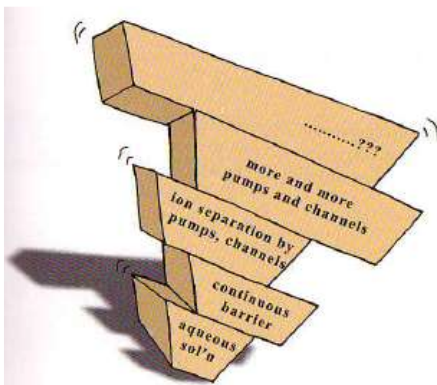


Figura 3.4. Mecanismos desconcertadamente complejos para la función celular se apoyan sobre una serie de cuestionables supuestos.

SECCIÓN II

CONSTRUYENDO DESDE LOS CIMIENTOS

Esta sección investiga la función celular elemental, con énfasis sobre el agua y las superficies proteicas. Vemos cómo la interacción entre estos dos elementos puede dar surgimiento al particionamiento iónico, el potencial celular, y varios otros de los rasgos distintivos más básicos de la fisiología celular de formas que difieren con las explicaciones vigentes.



La Gran Ola en Kanagawa, 1823 - 1829, por Katsushika Hokusai

CAPÍTULO 4: AGUA

Para los químicos, el agua es una sustancia detrás de cuya simple estructura se disfrazan propiedades formidablemente complejas. Para los científicos de la vida el agua es un poco interesante mar que baña a los protagonistas de la vida. Este océano es ignorado, como lo refiriera Albert Szent-Györgyi, “tal como el pez se olvida del agua en el mar”. El agua es considerada como poco más que un portador neutral. A pesar de que ninguna teoría específica fue propuesta, la claridad de los argumentos de Troshin y la fuerza de su evidencia inspiraron un fuerte acompañamiento no sólo en Rusia sino también entre los científicos de Europa del Este (Ernst, 1970; Szent-Györgyi, 1972; Tigyí *et al.*, 1991).

El agua celular también constituyó el tema central del clásico libro de 1972 de Szent-Györgyi sobre *El Estado Viviente*. Según Szent-Györgyi (quien ganó el premio Nobel por su descubrimiento de la vitamina C), la característica dominante del estado viviente es la interacción entre macromoléculas y agua: las macromoléculas inducen una estructura en las moléculas de agua circundantes, y el agua estructurada protege, separa y también vincula a las macromoléculas.

Bastante independientemente, una teoría similar empero más extensiva fue desarrollada por Gilbert Ling. En su primer libro, *Una Teoría Física del Estado Viviente*, publicado en 1962, Ling sugirió sucintamente que el agua celular podría ser diferente al agua suelta, y luego prosiguió con la presentación de evidencia detallada sobre la amplia estructuración del agua dentro de la célula (Ling, 1965). Se proponía que la estructuración se originaba en las superficies proteicas cargadas, a las cuales las moléculas de agua podían adsorberse debido a su naturaleza polar. Una vez que se adhería una única capa, capas adicionales se adherirían una sobre la otra, formando una red multi-estratificada. Dado que el agua estructurada era un solvente pobre para la mayoría de iones, argumentó Ling, muchos iones incluyendo al sodio eran naturalmente excluidos del citoplasma. Por el otro lado, se afirmó que la acumulación intracelular de potasio característicamente alta se debía a la alta afinidad de ese ion por los grupos carboxilo negativamente cargados de las proteínas. Por ende, el particionamiento iónico esencial podría ser explicado por esta teoría –basada en gran parte en las propiedades físicas del agua estructurada.

Pese a que la tesis de Ling fue acogida calurosamente por los rusos y los europeos orientales, fue recibida con escepticismo por los científicos occidentales, quienes en su mayoría desconocían el trabajo complementario de Troshin. Para estos científicos resultaba particularmente difícil el implícito descarte de las bombas de membrana, las cuales habían comenzado a atraer considerable atención. En la teoría de Ling las bombas eran innecesarias; el particionamiento de todos los solutos podría explicarse mediante una combinación de asociación con proteínas y una reducida solvencia del agua celular. La visión de Ling sobre el agua celular implicaba el rechazo del aparentemente bien consolidado paradigma de bombas-canales.

Cualquier esperanza que los seguidores de Troshin y Ling pudiesen haber mantenido respecto de avanzar en sus visiones fue frustrada por la debacle de la poliagua. A fines de la década de 1960 un grupo ruso (Derjaguin, 1966;

Anisimova *et al.*, 1967) describió columnas especiales de agua cultivadas en capilares de cuarzo. Dado que esta agua poseía propiedades inusuales fue considerada “anormal” y más tarde fue renombrada “poliagua” por científicos occidentales (Lippincott *et al.*, 1969, 1971), cuya aceptación entusiástica proporcionó un aura de significancia a este fenómeno de basamento ruso. Al cabo de unos pocos años se tornó claro para casi todo el mundo que estas columnas de agua eran un artefacto –no eran aparentemente agua estructurada *per se* sino geles formados alrededor de impurezas lixiviadas desde los capilares de cuarzo (Lippincott *et al.*, 1969, 1971; Brummer *et al.*, 1972).

Pero descubrimientos sorprendentes de científicos físicos han reabierto la puerta de la consideración. Me estoy refiriendo en gran parte al trabajo de Israelachvili, Pashley, Granick, Parsegian y otros, cuyos estudios experimentales sobre solventes en la proximidad de superficies dejan poca duda de que las superficies impactan profundamente al agua cercana. Consideramos a continuación algunos de estos estudios.

AGUA DE SUPERFICIE

El principio subyacente a gran parte de este trabajo moderno puede ser comprendido a partir del diagrama de la Figura 4.1. Tome una gota de líquido y póngala entre una bola pesada y una mesa. La presión ejercida por la bola forzaría al líquido hacia fuera, primero rápidamente y luego más lentamente. La sorpresa es que la bola nunca llega a alcanzar la mesa; una película de agua permanece indefinidamente intercalada entre las superficies. Esta fina capa soporta la totalidad del peso de la bola. Para exprimir hacia fuera la película remanente, se debe ejercer una presión extraordinaria –el agua se aferra tenazmente entre las superficies.

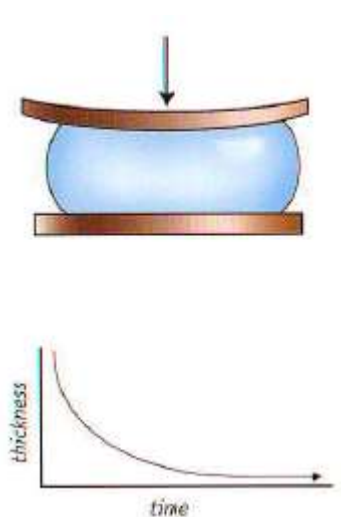


Figura 4.1. Efecto de la presión ejercida sobre un emparedado de fluido entre superficies. Según Granick (1991).

Semejante adherencia se constata en la experiencia común. Separar dos placas de vidrio apilada cara a cara no constituye problema alguno. Cuando las placas están mojadas, sin embargo, la separación es prácticamente imposible –las moléculas de agua intercaladas se aferran firmemente a las superficies de vidrio y entre sí, impidiendo la separación. Lo mismo sucede con la arena mojada. Comúnmente, tu pie se hunde profundamente en la arena de la playa, dejando una gran huella sin rasgos distintivos; pero en la arena húmeda tu pie difícilmente llega a hundirse. El agua adhiere a las partículas de arena, uniéndolas con una fuerza suficiente como para soportar tu peso entero.

Para entender la naturaleza de semejante adherencia, Israelachvili y colegas midieron la fuerza requerida para remover solventes intercalados entre superficies de mica paralelas (Horn y Israelachvili, 1981; Israelachvili y McGuiggan, 1988; Israelachvili y Wennerstron, 1996). Cuanto más cercanamente se disponían las superficies, mayor era la fuerza requerida (aunque la fuerza atractora de van der Waals empezaba a dominar una vez que las dos superficies prácticamente se tocaban). El comportamiento global fue en gran parte clásico, pero hubo una sorpresa.

La relación fuerza-separación no fue puramente monotónica. Superpuesta sobre la respuesta anticipada existió una serie de picos y valles de fuerza regularmente espaciados (Fig. 4.2). El espaciamiento entre picos fue equivalente al diámetro de las moléculas intercaladas, y esta correspondencia persistió sin importar cuál era el diámetro molecular del fluido intercalado. Tal correspondencia sorprendente implicaba que las oscilaciones habrían debido surgir a partir de una estratificación de las moléculas intercaladas –cada capa correspondiendo a cada oscilación. La estratificación molecular no debería haber constituido una total sorpresa, ya que lo mismo había sido sugerido muchos años atrás por Sir William Hardy (1931) en sus estudios sobre lubricantes alrededor de superficies metálicas. Si la primera capa se pega a la superficie, la segunda capa se pega a la primera, y así sucesivamente: esto explicaría por qué las superficies próximas se aferran unas a otras.

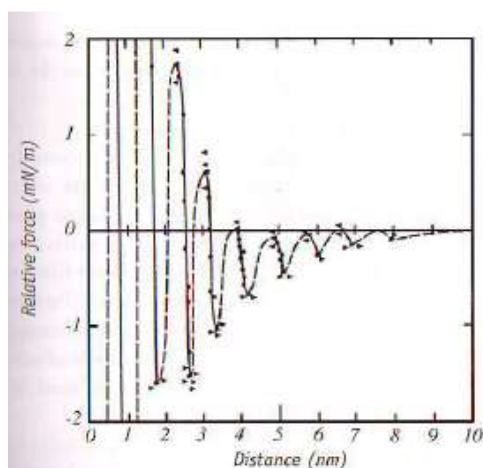


Figura 4.2. Efecto de la separación sobre la fuerza entre láminas de mica espaciadas cercanamente. Sólo se muestra la parte oscilatoria de la respuesta. Según Horn e Israelachvili (1981).

Bajo las condiciones específicas del experimento de Israelachvili, entre unos ocho a diez picos fueron detectables mientras las superficies se acercaban entre sí, implicando el ordenamiento de una cantidad similar de capas de solvente. El experimento fue repetido por Granick (1991), quien pudo detectar hasta 12 picos, implicando 12 estratos de solvente estratificados. Si el número de picos podría aumentar con futuros adelantos en la instrumentación resulta incierto; lo que si queda claro es que las superficies poseen la capacidad de organizar el solvente en por lo menos 10-12 capas.

Un segundo indicio de la estructuración multi-capa proviene de mediciones de la viscosidad del fluido intercalado. Los solventes comunes tienen una reconocida viscosidad en grueso. Pero si las moléculas de solvente están enlazadas entre sí, la viscosidad aumentará. Por ende, surgió la motivación para medir la viscosidad del fluido intercalado entre placas. Esto fue logrado a través de hacer deslizar una placa sobre la otra, midiendo la fuerza requerida para lograr hacerlo, y usando esta fuerza para computar la viscosidad (Granick, 1991). Cuando la separación entre placas era amplia, la viscosidad no difería de la viscosidad en grueso común. Pero a medida que las placas se iban

juntando más cercanamente la viscosidad comenzaba a aumentar, precipitadamente. El incremento empezaba a ser detectable a una separación de 5 nm, o aproximadamente 12 diámetros de solvente en ese estudio. Llegando a 2,5 nm la viscosidad había crecido a diez veces más que la alcanzada a 3,5 nm.

Varios estudios sugieren que los efectos estratificantes pueden desplegarse considerablemente más allá de los pocos nanómetros documentados más arriba. Cuando las mediciones de viscosidad antes mencionadas fueron conducidas con superficies de vidrio pulido y agua, el incremento en la viscosidad fue detectable a separaciones de superficie de 500 nm (Szent-Györgyi, 1972). Cuando se crearon películas de agua condensadas a partir del contacto de vapor con láminas de cuarzo (Pashley y Kitchener, 1979), el agua adherente se prolongó hasta 150 nm; estudios de seguimiento dieron 200 nm (Fisher *et al.*, 1981). Esto implica cientos de capas de agua adherentes. Y los efectos de atrapamiento proteico comúnmente inducidos por superficies pueden extenderse hasta 180 nm (Xu y Yeung, 1998).

Estos experimentos amplían aquellos de Israelachvili y Granick e implican que las superficies tienen la capacidad de estratificar moléculas de solvente vecinales hasta distancias de hasta 400-500 capas. La estratificación evidentemente depende de la naturaleza de la superficie, y la cuestión respecto de si el agua estratificada es nucleada similarmente por superficies biológicas no es consignada en estos estudios. El asunto había sido tratado en los diversos estudios más tempranos de Troshin, Ling y Szent-Györgyi los cuales, conjuntamente con los más modernos estudios no-biológicos, sugieren un tipo de universalidad del fenómeno de estructuración.

La exploración del tema de la estructuración del agua biológica consumirá el resto de este capítulo. Primero debemos comprender algunos conceptos básicos. Necesitamos tomar en cuenta las propiedades físicas del agua, como asimismo las propiedades físico-químicas de las superficies que interactúan con el agua. Mis disculpas si este material parece un poco de libro de texto.

LO BÁSICO SOBRE EL AGUA

El agua ha sido apreciada por mucho tiempo tanto como un líquido como asimismo un solvente. En relación a otros solventes, sus propiedades son inusuales debido a la combinación de un tamaño pequeño y una carga alta. La molécula tiene dos hidrógenos electropositivos en una punta, y un oxígeno electronegativo en la otra. Es generalmente modelada como cuatro cargas localizadas a lo largo de los cuatro brazos de un tetraedro (Fig. 4.3). Esto confiere a la molécula un sentido de direccionalidad –un dipolo que permite fuertes interacciones polares con un alto grado de orientación espacial.

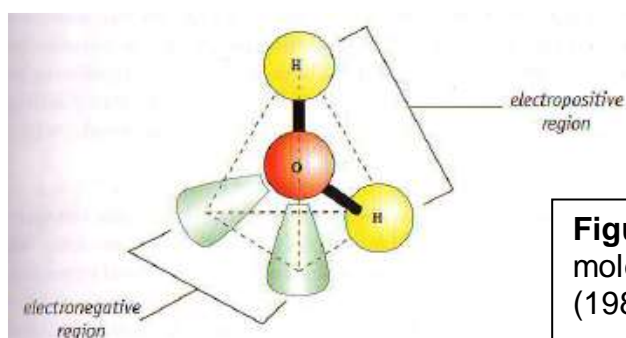


Figura 4.3. Distribución de carga tipo dipolo de la molécula de agua. Adaptado a partir de Alberts et al. (1989).

Cada molécula de agua contiene dos donantes, los protones, y dos aceptantes, los dos pares no compartidos de electrones del oxígeno. Esto hace que la molécula sea altamente reactiva. Es capaz de formar enlaces de hidrógeno con hasta cuatro vecinos más cercanos, o posiblemente seis si los enlaces de hidrógeno se bifurcan (Robinson *et al.*, 1996). Las interacciones agua-agua suscitadas a partir del enlazamiento de hidrógeno son relativamente débiles, alrededor de 3 – 5 Kcal. /mol. No obstante, la auto-asociación le confiere al agua la mayoría de sus propiedades físico-químicas.

El agua existe en tres estados usualmente conocidos –vapor, líquido y sólido– las cuales difieren en su asociación mediante enlaces de hidrógeno. En el estado de vapor la energía térmica es alta y las moléculas experimentan un movimiento aleatorio incesante. En el estado líquido la aleatoriedad es reducida y las moléculas forman entre si enlaces de hidrógeno transitorios en una escala temporal de 10^{-11} segundos; pueden agregarse transitoriamente en cadenas originariamente denominadas “ramilletes aleteantes” (Frank y Wen, 1957), aunque la forma en que esto sucede permanece en debate. Los modelos moleculares modernos sugieren que a temperatura ambiente, un 75-80% del agua se halla asociada con tres o cuatro moléculas de agua vecinas, presentando una extensiva red tridimensional (Cf. Robinson *et al.*, 1996). Debido a la breve duración de estos enlaces, el agua permanece líquida.

En el estado sólido, o hielo, las moléculas de agua asumen una disposición diferente en la cual cada molécula se enlaza con otras cuatro (Fig. 4.4). Muchas configuraciones cristalinas son posibles, pero en la proyección bidimensional del cristal de hielo cada átomo de hidrógeno se halla en una línea recta entre dos átomos de oxígeno. La rectitud del enlace de hidrógeno confiere estabilidad y da cuenta de la solidez del hielo. También explica por qué la estructura del hielo es más bien abierta, con una densidad (a 0 °C) de sólo 0,92. Los cubos de hielo flotan.

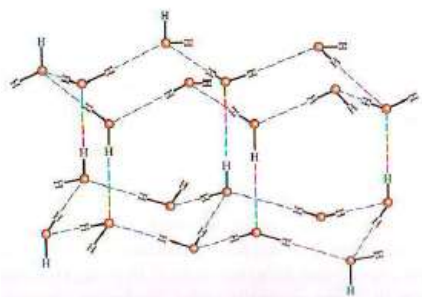


Figura 4.4. Estructura molecular del hielo. Enlaces de hidrógeno interconectan a las moléculas. Adaptado a partir de Stillinger (1980).

Situada en algún lugar entre el agua líquida común y el hielo se halla la así denominada agua e estructurada o estratificada. Dado que se la encuentra cerca de interfaces también se la llama agua interfacial. El agua interfacial es lo suficientemente diferente de los otros tres estados del agua como para que Sir William Hardy a comienzos del siglo XX sugiriese que es un “cuarto estado” de la materia, más allá del sólido, el líquido o el vapor. En el agua estructurada las moléculas de agua se hallan vinculadas, pese a que menos regularmente que en el hielo. Dado que los enlaces de hidrógeno están torcidos (Cf. Pauling, 1959), la densidad del agua estructurada es más alta que la del hielo, permitiendo que las moléculas se amontonen juntas más cercanamente (Garrigos *et al.*, 1983). Los enlaces torcidos pueden brindarle complacencia a la estructura, de modo tal que la formación es menos rígida que el hielo y no necesariamente son de dimensión fija.

En realidad, existen por lo menos dos tipos de agua interfacial, dependiendo de que la superficie interfacial sea o hidrofóbica o hidrofílica. Las superficies hidrofóbicas inducen el enlazamiento entre moléculas de agua vecinas. El enlazamiento da lugar a elementos pentagonales de 5Å, los cuales se van formando en vastas redes de conformación semejante a una jaula llamados clatratos (Wiggins, 1990; Vogler, 1998). Un enlazamiento de agua inducido como este explica por qué las superficies hidrofóbicas son escasamente solubles en agua: no es debido a que las superficies hidrofóbicas se asocian entre sí tan fuertemente, pese a que ellas en última instancia interactúan a través de fuerzas de van der Waals de corta distancia, sino más bien debido a que el agua circundante está pre-ocupada en una extensiva auto-asociación, y se halla por ende inaccesible para la solubilización.

El segundo tipo de agua interfacial es el hallado cerca de superficies hidrofílicas. Los elementos cargados y polares de las superficies hidrofílicas reaccionan fuertemente con el agua dipolar, lo cual vence la tendencia del agua a auto-asociarse. La reacción crea las capas de agua adherente descritas anteriormente. Por ende, las superficies hidrofílicas inducirán la estratificación, mientras que las superficies hidrofóbicas inducirán la formación de clatratos.

¿Qué tipo de agua puede ser previsto dentro de la célula? El cuadro es evidentemente complejo porque la célula contiene superficies de toda especie concebible. Por ende, puede esperarse algo de agua de cada tipo –clatrato, estratificada y suelta. Por el otro lado, un tipo macromolecular domina el citoplasma: la proteína. Cualquiera sea el tipo de agua que rodea comúnmente a la proteína debería por lo tanto constituir la mayor porción de agua en la célula.

Las proteínas contienen elementos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos. Típicamente, elementos hidrofóbicos yacen enterrados en el centro proteico, dejando a los elementos hidrofílicos superficiales y expuestos al agua. Dado que estos contienen muchas cargas y elementos polares, tales superficies deberían inducir la estratificación del agua. Si la estratificación es sustancial, ésta podría explicar la conocida resistencia del agua celular al congelamiento – dado que las moléculas de agua estratificadas se hallan limitadas y por tanto imposibilitadas para reestructurarse fácilmente hacia una configuración del tipo del hielo.

La posibilidad de la estratificación del agua es considerada a continuación, mientras exploramos la naturaleza de las superficies proteicas con algún detalle.

SUPERFICIES PROTEICAS

El rasgo característico de las superficies proteicas es que se hallan tachonadas con cargas. Las proteínas están constituidas por una larga cadena de aminoácidos, conformando una columna vertebral con cadenas laterales. Las cargas provienen de ambos los grupos carbonilos (-) y amino (+) y de las cadenas laterales (+ o -). Por ende, cada aminoácido presentará varias cargas. Dado que estas cargas se hallan situadas principalmente sobre la superficie de la proteína más que en su interior, la superficie se hallará densamente revestida con carga.

Estas cargas deberían ejercer un profundo efecto sobre el agua vecinal. En virtud de su naturaleza bipolar, la molécula de agua será atraída; para minimizar la energía potencial se adsorberá (Fig. 4.5 A). La adsorción de agua a proteínas no es una idea nueva. Fue esbozada por Linus Pauling (1945), quien propuso que el sitio de la adsorción era la cadena lateral de aminoácido, mientras que enfoques incluso anteriores (Jordan-Lloyd y Shore, 1938) sostenían que la responsabilidad yacía tanto en las cadenas laterales como también en los grupos amino y carbonilos de la columna vertebral. De ambas formas, se supone que las moléculas de agua vecinales se hallen orientadas por la carga superficial, y esta expectativa es ahora confirmada por la experimentación moderna (Toney *et al.*, 1994). El tema es si meramente sucede con una capa o dos, o con la multiplicidad de capas denotadas a partir de los estudios arriba descritos.

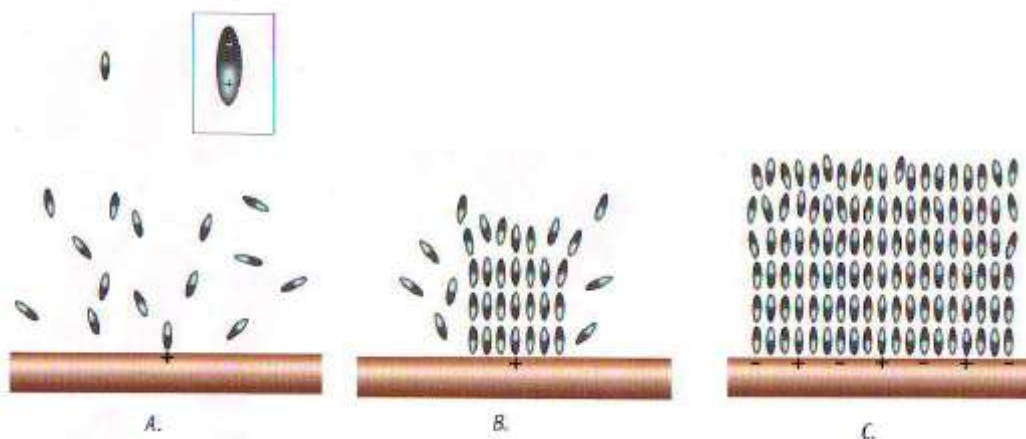


Figura 4.5. Organización del agua cerca de una superficie proteica. (A) Un dipolo de agua se adsorbe al sitio de carga proteica. (B) El dipolo adsorbido induce la adsorción de dipolos adicionales. (C) Sitios de carga proteica adicionales refuerzan y extienden la red de dipolos.

Antes de dilucidar esta cuestión resulta útil consignar un asunto potencialmente desconcertante para la situación biológica: la competición. La célula no sólo retiene agua sino también iones. Estos iones competirán categóricamente por los sitios cargados de las proteínas. Hemos de contemplar, sin embargo, la dominancia abrumadora del agua. Calculada de forma estándar, la concentración de agua dentro de la célula es 55 molar. La concentración de potasio, fácilmente el ión más abundante en la célula, es apenas 0,1 molar. Con 500 moléculas de agua por cada potasio, queda claro que la presencia de iones no altera seriamente la tesis –las cargas de superficie deberían orientar a las moléculas de agua.

¿Por qué, entonces, las moléculas de agua orientadas deberían formar estratos? Esta característica deriva directamente de la naturaleza dipolar de la molécula (Fig. 4.5 B). Una vez que una única molécula es adsorbida, otras se alinearán por simple atracción. Ellas se alinean lateralmente en tanto un dipolo se orienta lado a lado con otro, y estos se alinean verticalmente en multicapas. La estratificación es la consecuencia inevitable de la naturaleza fuertemente dipolar de la molécula.

La exacta cantidad de capas que pueden formarse depende principalmente de dos factores rivalizando: la fuerza del centro organizador y la potencia de las fuerzas térmicas que tienden a desbaratar la organización inducida. La fuerza térmica es significativa pero no aplastante: a temperatura ambiente la energía

térmica es alrededor de 10 veces más débil que la energía cohesiva del enlace de hidrógeno (Szasz *et al.*, 1994). Por lo tanto, las fuerzas térmicas tenderán a ser sólo moderadamente disruptivas. En cuanto al centro organizador, un rol fundamental debería ser ejercido a través de la distribución superficie-carga. Si el espaciamiento de carga es escaso, habrá poca oportunidad para el reforzamiento lateral; la organización se disipará con la distancia a partir de la carga, y sólo podremos esperar agrupamientos de organización alrededor de cada carga (Fig. 4.5 B).

Para un reforzamiento considerable, las cargas en la superficie proteica deberán hallarse densamente amontonadas. Quizás es intuitivamente obvio que la distribución superficial más efectiva debiera ser un patrón tipo tablero de damas cuya unidad de espaciamiento es un múltiplo entero del diámetro de la molécula de agua (Ling, 1965; Szent-Györgyi, 1972); la estructuración inducida por una carga podría entonces reforzar la estructuración inducida por la próxima (Fig. 4.5 C).

La imagen presentada en la figura 4.5 está obviamente híper simplificada. Primero, al representar la molécula como un simple poroto, subvierte la bien conocida estructura tetraédrica del agua. En segundo lugar, implica que las moléculas de agua son estáticas; las moléculas de agua deberían hallarse en movimientos cinéticos perpetuos similares a aquellos de capas más distantes, con la magnitud de movimiento disminuyendo con la proximidad a la superficie. Las posiciones moleculares mostradas representan un promedio estadístico. Tercero, la ilustración denota que las superficies se hallan infinitamente lejos una de otra, mientras que una superficie cercana debería realmente reforzar el ordenamiento. Y cuarto, las superficies proteicas no son planas. Aun así, la figura resulta útil por brindar una imagen intuitiva de la estratificación prevista.

Para determinar si la organización de la superficie proteica dada a entender por la Figura 4.5 C está realmente realizada, consideremos los dos principales bloques de construcción de las proteínas, la beta-lámina y el alfa-hélice.

La beta-lámina es una característica de superficie dominante en muchas proteínas globulares. Una lámina ideal es mostrada en la Figura 4.6. Está conformada por una larga cadena polipeptídica que se pliega sobre sí misma múltiples veces, corriendo en cada viraje en una dirección opuesta a la de su doblez vecino. Los dobleces son mantenidos juntos mediante puentes de hidrógeno. Los grupos carbonilo y amino de la columna vertebral, los cuales acarrear respectivamente cargas negativas y positivas, se repiten aproximadamente cada 7 Å.

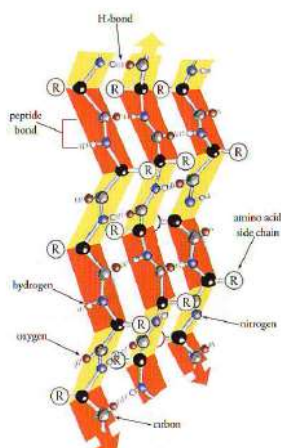


Figura 4.6. Estructura de la beta-lámina. Según Alberts *et al.* (1994).

El alfa-hélice es una estructura incluida en muchas proteínas globulares también, y es también el principal elemento utilizado para construir proteínas tipo bastón, fibrosas. Los sucesivos virajes de la hélice se mantienen unidos por puentes de hidrógeno (Fig. 4.7). Frecuentemente, dos hélices como estas se enroscan entre sí para formar una espiral enrollada. A lo largo de la extensión de la superficie de la espiral hay una alternancia de carga regular. En el bastoncillo de miosina, cargas negativas y positivas alternan axialmente con una periodicidad de 9,3 residuos de aminoácidos (McLachlan y Karn, 1982). Esto se traduce en una repetición lineal de 14 Å, o de 7 Å entre cargas disímiles. Nuevamente, la regularidad prevalece.

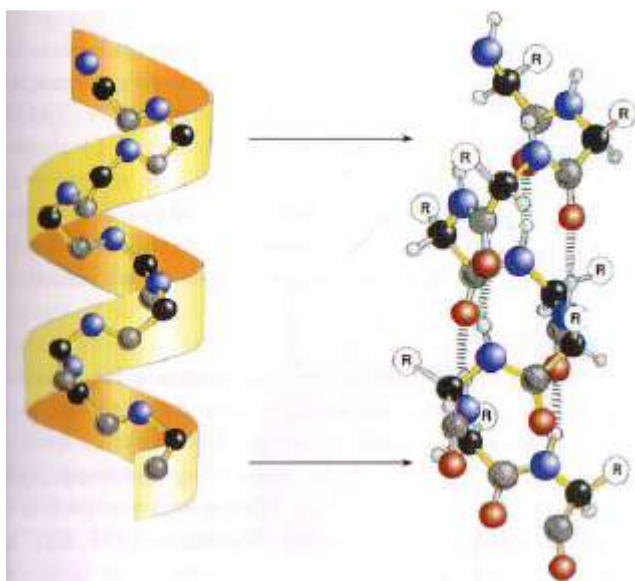


Figura 4.7. Estructura del alfa-hélice. Según Alberts *et al.* (1994).

Debido a que las cargas de los bloques de construcción se hallan dispuestas regularmente, la regularidad de carga debería existir asimismo en la proteína. Un buen ejemplo para observar es la actina, una proteína ubicuitaria hallada en todas las células eucarióticas. La cristalización de actina hizo posible la construcción de mapas de carga superficial. Estos mapas muestran regiones de cargas negativas y positivas amontonadas en las superficies tanto frontales como posteriores de la molécula (Henessey *et al.*, 1993).

Lo que debemos preguntarnos es si tales repeticiones de carga podrían reforzar adecuadamente el conjunto del dipolo. ¿Encajarían integralmente los dipolos de agua dentro del array superficie-carga? Esta pregunta es análoga a preguntar si tus pies pueden ser posicionados sobre dos puntos del piso arbitrariamente espaciados. La respuesta en ambos casos es sí, dentro de un alcance –ya que tal como tus piernas, los dos hidrógenos de la molécula de agua son un poco separables. Por ende, la molécula de agua no tiene un “tamaño” exacto, y consecuentemente, resulta poco probable que el valor requerido de repetición de carga superficial sea crítico pese a que algún valor óptimo es inevitable.

Para estimar la razonabilidad de semejante esquema de estructuración acuosa, uno podría comparar el tamaño del agua con el tamaño de la repetición de carga superficial. El área de superficie de la molécula de agua fue recientemente estimada en $\sim 9 \text{ \AA}^2$ (Robinson y Cho, 1999) con una dimensión lineal que puede extenderse hacia los extremos desde 2 hasta 4 Å. Repeticiones de bloques de construcción de 7 Å y 14 Å, como fuera observado, alojan por tanto alrededor de entre dos a siete moléculas de agua. Para un

fuerte reforzamiento, el espaciamiento de carga cada pocas moléculas de agua parecería razonable.

Una predicción de este paradigma resulta que todas las otras superficies iguales con el espaciamiento de carga más regular deberían estructurar mucho más agua. Para chequear esto, identificamos una situación con extrema estructuración ácuea y vemos si acaso la repetición de carga es correspondientemente regular. El paradigma que viene a la mente es el de las proteínas “anticongelantes” de la naturaleza, las cuales presumiblemente median su resistencia al congelamiento a través de la estructuración de muchas capas de moléculas de agua vecinal, inhibiendo por ende la transición del agua hacia el estado de hielo. Como excelentes estructuradoras, es anticipable que las proteínas anticongelantes tengan cargas de superficie que se repiten de forma extremadamente regular.

De hecho, el sello distintivo de tales proteínas y glucoproteínas es su regularidad de carga. La columna vertebral proteica es un alfa-hélice con un característico motivo alanina-alanina-treonina que se repite una y otra vez. La repetición de carga a lo largo de la hélice ocurre con una periodicidad axial de 11 residuos aminoácidos, o cada 16 Å (Chou, 1992). La extrema regularidad de la repetición confirma nuestra presunción, e implica que el valor de 16 Å podría ser uno que es excepcionalmente efectivo para estructurar el agua. Esta repetición de 16 Å es quizás más eficaz que, digamos, la repetición de 14 Å característica del bastoncillo de miosina.

En suma, los rasgos distintivos requeridos para la efectiva estructuración del agua parecen hallarse presentes en las superficies proteicas. Las superficies se hallan densamente pobladas con carga, y las cargas se presentan en patrones regularmente repetitivos. Podría no ser una exageración el especular que semejante regularidad de carga existe merced a un diseño –principalmente para organizar el agua vecinal. De hecho, la estructuración ácuea como característica central del diseño proteico ha sido sugerida anteriormente (Watterson, 1991, 1997).

INTIMIDAD DE SUPERFICIE

¿Cuánto del agua celular podría ser organizada por sus proteínas? Si las proteínas citoplasmáticas se hallasen diluidas, la fracción estructurada debería permanecer pequeña. Si el citoplasma está atestado de proteínas, entonces la fracción estructurada podría alcanzar la escala global.

En gran parte gracias al trabajo pionero de Keith Porter, ahora queda claro que el citoplasma está relativamente apiñado. Porter ha sido capaz de visualizar un fino tejido de malla de delicadas hebras proteicas llamado grilla microtrabecular que reviste el citoplasma (Porter *et al.*, 1983). Durante algunos años este enrejado sólo pudo ser observado mediante un microscopio electrónico de alto voltaje y fue por tanto motivo de controversia. Actualmente es visualizable también a través de microscopía electrónica estándar (Trombitás y Pollack, 1995). Esta matriz impregna el citoplasma y lo dota con numerosas superficies cercanamente espaciadas (Fig. 4.8). El análisis de micrografías electrónicas de alto voltaje revela que en el seno de esta grilla trabecular más de la mitad del agua se halla situada a una distancia dentro de los 5 nm de alguna superficie evidente (Clegg, 1988).



Figura 4.8. Visión estereo del citoplasma de una célula BSC-1, ilustrando finas microtrabéculas filiformes y matriz citoplasmática. Las puntas de flecha indican ribosomas; las flechas, microtúbulos. Micrografías de Schliwa (1986).

Si a usted le gustan los números, podría estar interesado en la fracción de la célula ocupada por el enrejado. La fracción de volumen ocupada por la red microtrabecular, junto con los microtúbulos y los filamentos intermedios que componen el citoesqueleto, ha sido mensurada y es de apenas por debajo de un 20% (Gerson *et al.*, 1985).

Se estima que el área de superficie presentada por estas estructuras es de $80.000 \mu\text{m}^2$ para una célula de $16 \mu\text{m}$, o de alrededor de 100 veces más que el área de la superficie de la membrana celular. Asumiendo que cada proteína, para simplificar, fuese una esfera, podemos calcular que la distancia de superficie a superficie sea de $\sim 6 \text{ nm}$, un valor no muy diferente del de 5 nm antes mencionado.

Valores similares pueden obtenerse a partir de representaciones de escala del tejido de malla repleto de estructura semejante a la que se muestra en la Figura 4.9. Rara vez (en dos dimensiones) las brechas miden más que unos pocos nanómetros.

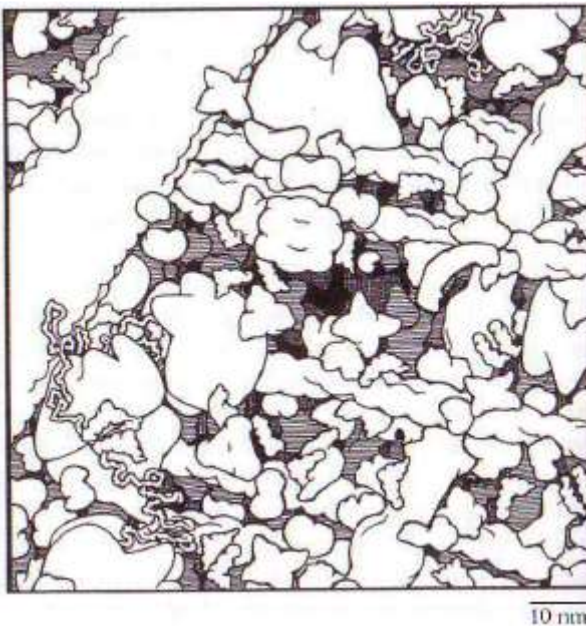


Figura 4.9. Interpretación a escala de citoplasma de célula de lavadura. El dibujo incluye elementos citoesqueléticos y otras proteínas. Según Goodsell (1991).

Mientras que todos estos métodos visuales revelan distancias de superficie a superficie del orden de los 5 nm , las micrografías electrónicas sobre las cuales se basan identifican solamente moléculas con una alta densidad electrónica.

Sin embargo, las regiones que aparecen vacías en las micrográficas podrían contener proteínas globulares, enzimas y otras macromoléculas intracelulares que no son puestas en evidencia debido a una más baja densidad electrónica o a un menor tamaño. Estas entidades llenan los espacios como pelotas en jaulas y deberán de este modo disminuir en una extensión considerable las brechas de superficie a superficie. Por ende, el valor de 5 nm, correspondiendo a aproximadamente 14 capas de agua, sea probablemente un límite más alto.

El apiñamiento también es característico del espacio entre medio de las organelas. Mitocondrias, miofibrillas, fibras de stress, retículo endoplasmático, etc., contienen proteínas estructurales densamente aglomeradas con brechas de superficie a superficie también en la escala nanométrica, reducidos ulteriormente por enzimas interpuestas y otras moléculas. Por lo tanto, tanto afuera como adentro de las organelas, las típicas brechas entre superficies no suelen contener más que alrededor de 10-15 capas de agua, y probablemente menos.

Una aproximación independiente y quizás más cuantitativa para la estimación del tamaño de la brecha es la basada en consideraciones estequiométricas. Esto es cuestión de comparar el número de moléculas de agua con la cantidad de cargas de aminoácidos. El cálculo da una relación de 31:1 (Ling *et al.*, 1993, Pág. 201). Por ende, cada carga de aminoácido se halla, en promedio, en contigüidad con 31 moléculas de agua. Si se da por sentado que todas las cargas proteicas se sitúan en la superficie, y se asume que las moléculas de agua forman un cubo adyacente a cada carga, entonces la dimensión lineal del cubo será de $31^{1/3}$ o de aproximadamente tres moléculas de agua. La brecha entre superficies será entonces de dos veces tres moléculas, o de seis moléculas de agua de ancho.

Un valor similar es obtenido utilizando un tipo diferente de acercamiento estequiométrico. Una única capa de agua cubriendo la superficie proteica suma hasta un ~28% del peso total, lo cual virtualmente es independiente de la forma de la proteína (Fisher, 1964). Dos capas de agua alcanzarán un 56%, y tres llegarán a un 84%. Así, la típica fracción de agua celular del 70% contabiliza dos a tres capas de agua, lo cual da alrededor de cinco moléculas entre superficies.

En resumen, los abordajes microscópicos electrónicos brindan un límite más alto del ancho de la brecha de superficie a superficie de 10-15 moléculas de agua, mientras que los acercamientos estequiométricos señalan el valor en alrededor de cinco a seis moléculas. El tamaño de la brecha variará de un lugar a otro, pero la conclusión un tanto sorprendente es que las superficies se hallan asombrosamente cerca. Es como si las macromoléculas celulares fueran como piezas de rompecabezas que encajan libremente.

Dada una proximidad tal, ¿qué podemos esperar del estado del agua celular? En sistemas no biológicos hemos visto francas evidencias sobre 10 a 12 capas de agua estructurada adyacentes a superficies, con algunos experimentos denotando hasta muchas centenas de capas. Las brechas de superficie a superficie en la célula son quizás de una estrechez como de cinco o seis capas. Considerando la estrechez de las brechas, y el que las superficies macromoleculares están aparentemente diseñadas para conferir estructura, es bastante probable que una mayor fracción del agua celular sea multiestratificada.

Semejante expectativa es, sin embargo, en gran parte teórica; la pregunta fundamental es si realmente la estructuración implicada es confirmada a través de evidencia física directa.

EVIDENCIA SOBRE LA ESTRUCTURACIÓN DEL AGUA CELULAR

Separadamente a consideraciones sobre viscosidad que enfrentaremos más adelante, los acercamientos experimentales a la cuestión de la estructuración ácuea caen dentro de tres categorías principales: resonancia magnética nuclear, dispersión dieléctrica de ultra-alta frecuencia y dispersión neutrónica cuasi-elástica –rótulos que retuercen la lengua, para los cuales se han asignado acrónimos simples. Todos estos métodos comprueban si las moléculas de agua celular están más restringidas que las moléculas de agua suelta, las cuales se encuentran relativamente libres para danzar.

En el método de la resonancia magnética nuclear (RMN), la muestra es situada en un campo magnético estático. En dirección perpendicular a este campo estático, un campo magnético oscilante es impuesto. El campo oscilante conduce los núcleos (protones) de los dos hidrógenos del agua hacia un estado excitado. Entonces, el campo oscilante es apagado repentinamente y los núcleos de hidrógeno “se relajan” a medida que disipan su energía magnética extra. La relajación hacia el estado basal requiere una determinada cantidad de tiempo, de la cual el determinante decisivo es el grado de interacción con las moléculas adyacentes. Por ende, los núcleos de hidrógeno en agua restringida se relajarán más rápidamente que en agua irrestricta.

Para el agua celular el tiempo de relajación es en efecto más corto que para el agua común (Odeblad *et al.*, 1956; Bratten *et al.*, 1965; Cope, 1969; Hazlewood *et al.*, 1969; Cameron *et al.*, 1988; López-Beltrán *et al.*, 1996). Estos resultados implican que el agua celular se halla relativamente más estructurada, pese a que no revelan si la restricción afecta al agua celular en su totalidad o sólo a un porcentaje de su agua. La restricción también está confirmada por mediciones relacionadas del coeficiente de auto-difusión del agua (Rorschach *et al.*, 1991), y particularmente mediante mediciones de un gran viraje químico pertinente a una solución salina común (Kasturi *et al.*, 1987), lo cual implica una estructuración global.

Quizás son más reveladores aquellos estudios de RMN que examinan el agua celular a lo largo de un período durante el cual la célula está funcionando. Células HeLa y de ovario de hámster fueron exploradas mientras atravesaban su ciclo mitótico (Beall, 1980; Rao *et al.*, 1982). El agua estaba restringida durante todas las fases excepto la de mitosis activa, cuando una disminución de la estructuración parecía correlacionarse con la disminución de las superficies de cromatina disponibles para conferir estructura. Una correlación temporal sistal fue encontrada en células de huevo del camarón de la salmuera (Cameron *et al.*, 1987). Nuevamente aquí, se halló que el grado de estructuración ácuea durante el ciclo celular se correlacionaba con la cantidad de proteína filamentosa, en este caso la actina. Estos estudios son significativos por el hecho de que monitorean un fenómeno en el mismo tejido como una función del tiempo.

El método de la dispersión dieléctrica de ultra-alta frecuencia (DDUAF) provee una segunda oportunidad para comprobar la restrictividad del agua. Las

moléculas de agua tienden a alinearse en un campo eléctrico a causa de su naturaleza dipolar. Si la dirección del campo es revertida, las moléculas darán “media vuelta”, como soldados respondiendo a una orden. En tanto la frecuencia del campo impuesto no sea demasiado alta, las moléculas continuarán sacudiéndose a demanda; pero cuando la frecuencia es elevada más allá de un valor crítico, las moléculas dejarán de ser capaces de responder oportunamente. El dipolo efectivo es entonces aparentemente más débil, y la “constante dieléctrica” dícese ser más baja.

Para el agua común, la frecuencia crítica para este debilitamiento es de 20 GHz. Para el agua restringida, donde el movimiento es más dificultoso, la frecuencia crítica será más baja. En el hielo, por ejemplo, cuyas moléculas se hallan sumamente restringidas, la frecuencia crítica cae precipitadamente a 10 KHz. Mediciones en células arrojan valores intermedios entre el hielo y el agua. En cistos de camarón de la salmuera, los cuales son particularmente útiles para tales estudios en virtud de su alto contenido en proteína, las mediciones dan valores de 5 – 7 GHz (Clegg *et al.*, 1982; 1984). Mediciones en tejidos de conejo muestran un grado similar de restricción (Gabriel *et al.*, 1983). Un estudio en células vegetales (Pissis *et al.*, 1987) mostró un 30% de moléculas de agua firmemente restringidas, un 70% restringidas en menor grado, y esencialmente nada de agua libre.

Un tercer método para estudiar la estructura del agua es el dispersión neutrónica cuasi-elástica (DNCE). Los neutrones lentos chocando contra el agua serán disipados en todas las direcciones. El espectro energético de los neutrones dispersados será estrecho si el agua es restringida, y crecientemente amplio dependiendo de la libertad traslativa y rotacional de las moléculas bombardeadas. A partir de los datos obtenidos mediante DNCE, podemos inferir los coeficientes de difusión tanto traslativos como rotacionales. El método es más ventajoso que los dos previos en cuanto mide el comportamiento medio de todas las moléculas ensayadas. Mientras que algunos de los métodos de RMN y DDUAF pueden ser influenciados excesivamente por una pequeña fracción de agua, el método de DNCE constituye un reflejo del promedio.

En células musculares de rana, el coeficiente de difusión rotacional es reducido por dos veces en relación a una solución de KCl común (Heidron, 1985; Rohrschach *et al.*, 1987). En cistos de camarón de la salmuera, los coeficientes de difusión trasnacional y rotacional son reducidos respectivamente en tres y 13 veces (Trantham *et al.*, 1984). Por lo tanto, esto indica una restricción sustancial del agua celular.

Resumidamente, los tres métodos físicos muestran que un porcentaje sustancial del agua intracelular se halla estructurada. Si acaso este porcentaje se acerca al 100%, tal como lo sugiere la estrechez de las brechas de superficie a superficie, o es menor, es algo que todavía no fue establecido con certidumbre.

Si el agua está adsorbida a superficies macromoleculares, muchas de las características físicas “anómalas” del comportamiento celular a las cuales hemos estado aludiendo adquieren concordancia. Estos rasgos distintivos incluyen: la elevada viscosidad del agua celular hasta varios órdenes de magnitud por encima de la viscosidad del agua suelta (Sato *et al.*, 1984; Luby-Phelps *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1993; Bausch *et al.*, 1999) –aunque los

métodos de fluorescencia frecuentemente arrojan valores no muy diferentes a los del agua suelta (Fushime y Verkman, 1991; Luby-Phelps *et al.*, 1993); el tamaño celular predecible el cual depende del volumen de agua adsorbida; la resistencia a la pérdida de agua en plantas desérticas enfrentadas a meses sin lluvias; la inmunidad al congelamiento incluso en aguas árticas; y la capacidad de la célula de permanecer intacta incluso cuando es demembrada. Estos rasgos distintivos provienen directamente de la proclividad del agua a adherirse y estructurarse alrededor de macromoléculas celulares.

De hecho, el total de características físicas de la célula debería diferir de aquellas previsibles a partir del agua suelta. La Tabla 4.1 resume muchas de estas diferencias. La tabla muestra diferencias de viscosidad, compresibilidad, expansión térmica, etc. El agua adsorbida a superficies macromoleculares es diferente, y las células conteniendo este tipo de agua se comportarán diferentemente a las predicciones basadas en agua suelta.

Tabla 4.1. Comparación de algunas propiedades del agua pura y vecinal (Según Clegg y Drost-Hansen, 1991).

Propiedad	Suelta	Vecinal
Densidad (g/cm ³)	1,00	0,97
Calor específico (cal/Kg.)	1,00	1,25 +/- 0,05
Coeficiente de expansión térmica (°C ⁻¹)	250 x 10 ⁻⁵ (25°C)	300-700 x 10 ⁻⁶
(Adiab.) Coeficiente de compresibilidad (Atm ⁻¹)	45 x 10 ⁻⁶	60-100 x 10 ⁻⁶
Exceso de absorción de sonido (cm ⁻¹ x s ²)	7 x 10 ⁻¹⁷	~ 35 x 10 ⁻¹⁷
Conductividad de calor ((cal/seg.)/cm ² /°C/cm)	0,0014	~ 0.01-0,05
Viscosidad (cP)	,089	2-10
Energía de activación de conducción iónica (Kcal./mol)	~ 4	5-8
Frecuencia de relajación dieléctrica (Hz)	19 x 10 ⁹	2 x 10 ⁹

Una excepción a la regla de la estructuración acuosa sustancial alrededor de superficies proteicas es el caso de proteínas aisladas suspendidas en solución, donde está comúnmente probado que la estructuración se halla restringida sólo a unas pocas capas. Semejantes inferencias no son necesariamente relevantes a la situación dentro de la célula porque la extensividad de la estructuración depende de la preservación de la configuración natural de la proteína, lo cual podría no ser el caso cuando las proteínas son aisladas y suspendidas en una solución diluida. En el interior de la célula, la conclusión de que un gran porcentaje de agua se halla organizado de forma diferente al agua suelta es prácticamente universal: ha sido delineada por todos los científicos que conozco quienes recientemente se han tomado el tiempo para analizar el campo del agua biológica (Wiggins, 1990; Watterson, 1991; Clegg y Drost-Hansen, 1991; Mentré, 1995; Cameron *et al.*, 1997; Vogler, 1998). Esto no es algo nuevo ni radical.

CONCLUSIÓN

Este capítulo comenzó con el interrogante de si las moléculas de agua celular podrían estar constreñidas debido a su resistencia al congelamiento. Un fundamento para el constreñimiento fue identificado en las superficies hidrofílicas de las proteínas. Estas superficies contienen abundantes cargas superficiales regularmente dispuestas que atraen y orientan en capas al agua vecinal. Debido a que las brechas entre superficies son inesperadamente

estrechas –quizás cinco a seis moléculas en promedio- una abundante porción del agua de la célula es potencialmente estructurable, y la evidencia física confirma una estructuración apreciable.

La pregunta que surge naturalmente es: ¿cómo podría la presencia de agua estructurada impactar en la función celular? Para el impacto funcional, la consideración más relevante podría ser el manejo de solutos, y este tema es explorado en varios de los próximos capítulos. Si la solvencia del agua estructurada difiere de la del agua suelta, la diferencia podría proveer un fundamento para el particionamiento de solutos, lo cual, a su vez, podría brindar una respuesta potencialmente franca a la cuestión de la separación de iones a través de la frontera celular.

Nos ocuparemos primero de los solutos desprovistos de carga, y luego de los solutos cargados.



CAPÍTULO 5: SOLUTOS

En el capítulo previo concluimos que el agua celular era diferente al agua en bulto. Los dipolos de agua se adsorben a las superficies hidrofílicas cargadas que impregnan el citoplasma; los dipolos adsorbidos inducen la adsorción de dipolos adicionales, creando capas de agua organizada. La presencia de semejante agua en la célula se halla ampliamente confirmada (Clegg, 1984; Ling, 1992; Mentré, 1995; Cameron *et al.*, 1997). Ahora comenzamos a evaluar las implicaciones.

EXCLUSIÓN DE SOLUTOS

Si existe un solvente universal, ciertamente este es el agua. La amplia solvencia del agua surge de la naturaleza fuertemente dipolar de la molécula. Los dipolos se agregan alrededor de las cargas de los solutos, estabilizando efectivamente el reactante y permitiéndole permanecer independiente. Esto es el motivo por el cual el sodio y el cloruro no se agregan en solución a pesar de sus cargas opuestas.

En el agua que está estructurada, sin embargo, los dipolos se hallan preocupados. Como resultado, la mayoría de solutos son relativamente insolubles en agua estructurada, y se particionan al hallarse en agua en bulto ordinaria donde los enlaces de hidrógeno se hallan más libremente disponibles para la hidratación de solutos. Un caso similar aunque más extremo es el del hielo, donde los enlaces de hidrógeno rígidamente trabados tienden a excluir del todo a los solutos. En términos de solvencia, entonces el agua estructurada se halla situada en algún punto entre el hielo y el agua común suelta.

Para obtener una percepción más rigurosa respecto de cómo funciona la exclusión de solutos, necesitamos considerar la energética. Para un sistema en equilibrio, la energía libre se halla en un mínimo. Por lo tanto el particionamiento de un soluto entre agua estructurada y no estructurada puede ser determinado mediante la observación de la diferencia de energía libre estándar entre las dos fases y estableciendo la tasa de particionamiento que minimiza la energía libre.

La diferencia de energía libre estándar consiste en dos términos: un término de entalpía (energía) y un término de entropía. El término de energía está relacionado con el volumen de la molécula de soluto: Para ir desde el agua en bulto hacia el agua estructurada, el soluto necesita llenar el agujero dejado en el agua en bulto y excavar un nuevo hoyo en el entramado del agua estructurada. Cavar un pozo en la trama estructurada es algo desafiante, y pozos más grandes requieren más trabajo que pozos más chicos. Por ende, se requerirá más energía para disolver solutos más grandes que para los más pequeños.

Un factor adicional puede ingresar a veces dentro del término de energía y modificar esta simple dependencia del volumen. Este factor tiene que ver con la disposición de cargas superficiales sobre el soluto (Ling, 1992). Si las cargas están dispuestas de modo tal que encajan particularmente bien dentro de la trama de agua estructurada, será necesaria menos energía para excavar el pozo y la solubilidad será realzada. Para solutos que entran en esta categoría (ver más abajo), la solubilidad será más alta que la prevista en base al volumen solo.

El segundo término, la entropía, está relacionado a la restricción de motilidad del soluto. Un soluto alojado en agua estructurada no puede trasladarse o rotar muy libremente porque el ambiente le impone una restricción. Ya que la naturaleza tiende a maximizar la aleatoriedad, la restricción impuesta es desfavorable: actúa para mantener a los solutos afuera.

Como el término de energía, el término de entropía depende del volumen molecular del soluto. Para visualizar esto, consideremos la analogía de la telaraña (Fig. 5.1). La mariposa atrapada en la red y trabada en múltiples sitios se hallará esencialmente inmóvil mientras que el mosquito más pequeño quedará libre para serpentear. La especie más grande sufre más restricción de motilidad que la más pequeña. Análogamente para solutos, cuanto más grande el tamaño molecular mayor la restricción motriz y por ende más profunda la exclusión.

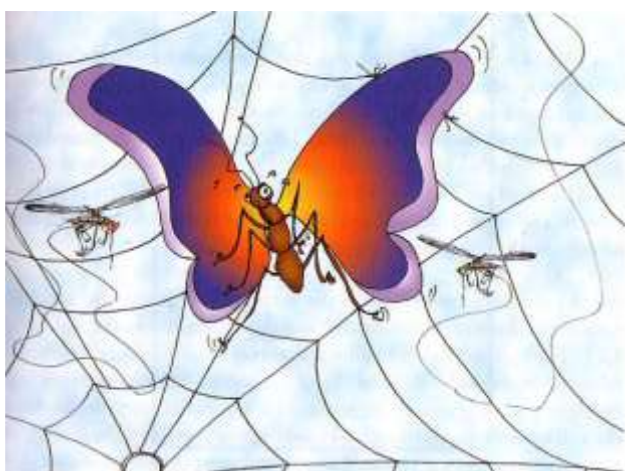


Figura 5.1. La restricción en la motilidad es más pronunciada para especies más grandes que para las más pequeñas.

En suma, la excavación de un hoyo (energía) y la restricción en la motilidad (entropía) son ambas desfavorables para la solvencia en agua estructurada; los solutos deberían ser excluidos. Dado que ambos términos son proporcionales al volumen del soluto, solutos de mayor volumen deberían sufrir más exclusión que los más pequeños. La única desviación a partir de esta norma es para aquellos solutos cuyos grupos de carga de superficie encajan cómodamente dentro de la trama de agua. Esos solutos especiales podrían experimentar menos exclusión que el resto. De otro modo, el principio es franco.

EXCLUSIÓN DESDE CÉLULAS

Consideraremos a continuación la posibilidad de que los solutos sean excluidos por el agua celular. Si la estructuración acuosa es un atributo citoplasmático (Capítulo 4), la exclusión basada en el tamaño debería ser evidente.

El acercamiento más comprehensivo a este interrogante fue realizado por Ling *et al.* (1993), quien estudió el particionamiento intracelular-extracelular de 21 solutos no cargados incluyendo azúcares, alcoholes y otros no-electrolitos que promediaban en su masa entre 32 y 900 Dalton. Cada soluto fue radio-etiquetado. El soluto etiquetado fue puesto en una solución de incubación conteniendo un músculo, y la concentración dentro del músculo fue medida luego de un período que se extendió hasta seis días. La temperatura fue mantenida a 0°C para asegurar que la célula no hubiese metabolizado apreciablemente alguno de estos solutos que fuesen metabolizables (algunos no lo eran), lo cual podría confundir los resultados. Con tales precauciones

tomadas, los autores determinaron la forma en que se particionaban los solutos de diferente tamaño.

Los resultados fueron francos. Primero, las concentraciones afuera y adentro fueron consistentemente proporcionales incluso transcurridos días de exposición: cuanta más alta era la concentración de un soluto afuera de la célula, más alta la concentración adentro. Esta simple proporcionalidad facilitó la determinación de cada coeficiente de partición exactamente. La proporcionalidad también implicó que resultaba poco probable que el mecanismo de particionamiento involucrara cualquier cosa muy complicada – no más complicada quizás que una simple diferencia física entre los respectivos fluidos.

El segundo y principal hallazgo fue que la tasa de partición desde el interior hacia el exterior disminuía a medida que el tamaño molecular aumentaba: *i.e.*, la exclusión desde la célula estaba basada en el tamaño. Los solutos más pequeños ingresaban a la célula bastante fácilmente con un coeficiente de partición de estado estable cercano a 1.0. Los más grandes enfrentaban una dificultad mayor, bajando los coeficientes de partición progresivamente hasta 0,08. De los 21 solutos estudiados, 14 cayeron en una única curva (Fig. 5.2). Para estos solutos, la exclusión dependió exclusivamente del peso molecular o, a su vez, del volumen del soluto computado, tal como se esperaba. Para los siete solutos restantes el coeficiente de partición también aumentó con el tamaño molecular, pero la curva fue desplazada levemente hacia la derecha (Fig. 5.2). El viraje hacia la derecha implica que este tipo de solutos entra en la célula con relativamente mayor facilidad. Al menos cinco de los siete solutos en cuestión (por ejemplo, etilenglicol, glicerol) son reconocidos crioprotectores, los cuales bajan el punto de congelamiento de la célula de forma bastante similar a las proteínas anticongelamiento (Capítulo 4). Si estos crioprotectores actúan a través de inducir a que el agua vecinal se torne más firmemente estructurada, entonces su encaje cómodo dentro de la grilla es implicado por su función. El desplazamiento a la derecha es comprensible.

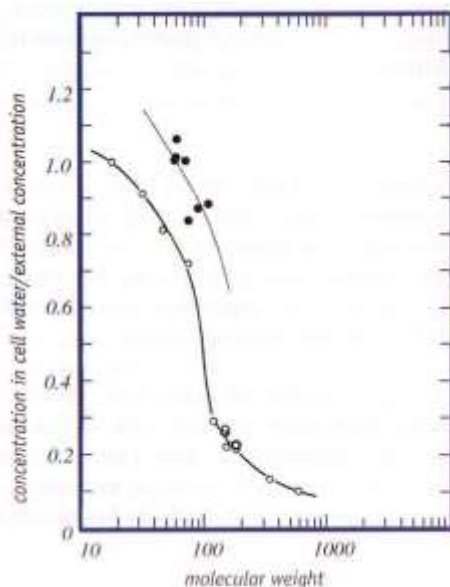


Figura 5.2. Experimento de particionamiento de solutos de diferente tamaño entre el interior y el exterior de la célula. Alberts *et al.* (1993).

Una derivación del principio de exclusión de soluto es que los solutos dentro de la célula no deberían difundir velozmente. Después de todo, si los solutos son excluidos de la grilla de agua, ¿por qué habrían de tener demasiada proclividad a difundir a través de ésta? Si tal raciocinio no es inmediatamente obvio,

pensemos en el hielo –el ejemplo más extremo de una grilla de agua estructurada. Imaginemos cómo cuán rápidamente un soluto como el azúcar difunde desde un costado de un cubo de hielo hasta el otro.

La expectativa de una lenta difusión intracelular está confirmada por evidencia experimental, aunque los resultados están de algún modo barajados. En un extremo del espectro hay estudios indicando solamente una tasa de difusión modestamente reducida vinculada al volumen: se constató que los fosfatos de alta energía, por ejemplo, difunden a una mitad de la tasa correspondiente al agua suelta (Yoshizaki *et al.*, 1982; Hubley *et al.*, 1995). Otros solutos muestran tasas de difusión mucho más reducidas. Para diversos dextranos, se constató una difusión del orden del 5-15% de la hallada en solución libre (Peters, 1984; Luby-Phelps *et al.*, 1986), con la difusión en la escala micronsima a veces requiriendo el transcurso de días (Kraft *et al.*, 1995). Para grandes solutos incluyendo a proteínas solubles, la tasa de difusión es típicamente del orden de un 10% hasta un 1% de la correspondiente a una solución acuosa libre (Wojcieszyn *et al.*, 1985; Maughan y Lord, 1988). Algún impedimento de la difusión es anticipable a partir de la presencia de obstáculos intracelulares, pero la magnitud no es cuantitativamente explicable (Gershon *et al.*, 1985); alguna otro rasgo distintivo del medioambiente parece ser responsable, y el agua estructurada resulta ciertamente un candidato.

Por el otro lado, virtualmente todos los procesos intracelulares requieren un rápido movimiento de soluto –lo cual implica tasas difusivas cualitativamente más altas que lo sugerido por gran parte de la evidencia. Los solutos realmente se mueven rápido cuando las células son activadas; tal movimiento será tratado en detalle en capítulos posteriores, y parece hallarse asociado con la desestructuración ácuea transitoria. Aquí nos ocupamos del estado inactivado, donde la difusión impedida es consistente con la estructuración del agua.

El objetivo de este capítulo ha sido cumplido. Nos disponemos a determinar cómo se comportan los solutos en el agua estructurada. Los argumentos teóricos predijeron una exclusión dependiente del tamaño, y esta predicción fue confirmada –los solutos son excluidos del citoplasma de acuerdo con su tamaño. El paradigma de exclusión de solutos es simple, y brinda los prolegómenos de un sistema para la función. Todo está bien –pero un tema queda pendiente.

¿Recuerdan el huevo crudo? A partir de la consistencia del huevo (particularmente cuando está fresco), comparamos el citoplasma con un gel, y fue en base a esto que primero especulamos que el citoplasma podría comportarse diferentemente a una solución acuosa común. El tema del agua citoplasmática ha sido ampliamente tratado, pero el asunto de si el citoplasma realmente se comporta como un gel todavía no fue explorado.

Pertrechados con algo de comprensión respecto del agua y los solutos, ahora podemos encarar este interrogante. La cuestión es significativa, dado que la ciencia y la tecnología de los geles son disciplinas de veloz expansión que han hallado aplicaciones en campos que abarcan desde las cápsulas de liberación temporizada de medicamentos hasta los lentes para discos compactos, y tienen potencialmente bastante para enseñarle sobre la célula a los estudiantes. Por ende, consideraremos si el citoplasma posee un atributo tipo gel.

CÉLULAS Y GELES

¿Qué es un gel exactamente? Les sorprendería saber que carecemos de una definición sobre la cual haya un acuerdo. Es algo bastante similar a la definición de pornografía de la Suprema Corte de los EE.UU. –es difícil de definir pero la reconoces cuando la ves. Lo mismo ocurre con el gel. Quizás la definición más útil es una que provino de un estudio de Almdal *et al.* (1993) titulado *Hacia una Definición Fenomenológica del Término “Gel”*. En esta visión, los geles son materiales blandos, sólidos o de apariencia sólida que consisten en dos o más componentes, uno de los cuales es un líquido de alguna abundancia. Por ende, el gel de la gelatina común (“Jello” en los EE. UU.) está compuesto de un tejido de malla de filamentos de colágeno enlazados transversalmente más aproximadamente un 95% de agua.

¿Por qué el agua se queda colocada en su lugar? En la célula hemos aventurado que el agua queda alojada porque se halla adsorbida a las superficies proteicas. Esto explica por qué las células no se desecan y por qué el volumen de la célula es predecible. Una fuerza retentiva similar deberá existir en el gel, ya que su agua también se halla sujeta. La masa de Jello no se reseca ni se colapsa inmediatamente; su 5% de colágeno retiene el 95% de agua. Otros (hidro) geles podrían retener su 99,9% de agua (Osada y Gong, 1993).

La explicación para la retención de agua comúnmente dada por los científicos de geles es que las superficies de la matriz son hidrofílicas –adsorben agua. Los polímeros de la matriz que son levemente hidrofílicos adsorberán modestas cantidades de agua, mientras que los polímeros que son fuertemente hidrofílicos pueden adsorber agua hasta miles de veces su volumen. Por lo tanto, el término hidrofílico implica no sólo una sino muchas capas de agua adsorbida. Pese a que los científicos del gel se refieren a este tipo de agua como agua “adherente” (Jhon y Andrade, 1973), existen pocos motivos para presumir que sea algo diferente al agua “estructurada” que se adhiere a las proteínas en la célula; la semántica podrá diferir pero el principio es el mismo.

El grado de estructuración de agua en la célula depende de la proximidad de las superficies yuxtapuestas, y lo mismo es verdad para el gel. Un estudio sobre geles comunes mostró que hasta un límite saturante, el grado de estructuración acuosa variaba con el grado de enlazamiento cruzado del polímero. Cuando las hebras de polímero se hallaban flojamente dispuestas, la RMN confirmó una pobre restricción del agua; pero a medida que un enlazamiento cruzado más extensivo atraía las superficies de filamento hacia una unión más próxima, el grado de restricción asimismo aumentaba (Yasunaga y Ando, 1993).

La estructuración del agua también implica resistencia al congelamiento, y tal resistencia constituye en gran parte un rasgo distintivo de los geles tanto como de las células. Para confirmar esto, compre un paquete de gelatina Knox (equivalente a la marca Royal de Argentina), prepare una solución al 1% en un recipiente de vidrio, cúbralo con un envoltorio plástico y póngalo en el freezer sin sacudirlo para no promover la formación de hielo. Incluso a una temperatura de -15°C permanecerá en estado de gel durante meses. El agua constreñida no ingresa en el estado cristalino del hielo –todavía otra indicación del estado estructurado del agua del gel.

Las células y los geles también son similares en su consistencia física –aunque de más está decir que no todas las células tienen la consistencia de la gelatina (Jello). La consistencia depende de la concentración de proteína así como también de la naturaleza de las respectivas superficies proteicas. Por ende, la célula muscular, densamente poblada de filamentos proteicos altamente cargados, será parecida a la gelatina, mientras que el citoplasma del óvulo embriológicamente rudimentario, relativamente libre de organelas y estructura, será de una consistencia más parecida al líquido (y se congelará más fácilmente).

Otro fundamento general para la comparación entre gel y célula se halla en el respectivo comportamiento de solutos. Si el citoplasma es como un gel, entonces la exclusión de solutos en base a su tamaño la cual caracteriza a la célula debería ser asimismo un rasgo distintivo del gel. Extensos estudios de impregnación de solutos fueron conducidos sobre geles de gelatina. Sobre la base del comportamiento tendiente a excluir, el agua pareció dividida en dos fracciones. En una fracción el agua estaba completamente disponible para solutos de cualquier tamaño, mientras que en la otra fracción, azúcares, alcoholes y otros solutos fueron excluidos en base al tamaño (Gary-Bobo y Lindenberg, 1969)

Otros tipos de gel también revelan exclusión de solutos. Geles tipo lámina hechos de polímero de celulosa-acetato contienen poros de 3 nm llenados con agua. Una gran fracción de este agua no se congelará aún a temperaturas tan bajas como de -60°C (Frommer y Lancet, 1972); tampoco admite solutos prontamente (Taniguchi y Horigome, 1975). En el polivinilmetil éter, se reportó una exclusión de sucrosa con una tasa de partición de entre 0,1 y 0,4 (Ling *et al.*, 1980). En geles de resina de intercambio iónico, se constató que los solutos eran excluidos según su volumen molecular (Ginzburg y Cohen, 1964). Por ende, el paradigma de exclusión de solutos es aplicable tanto para el gel como lo es para la célula: con el grado de estructuración del agua del gel, la exclusión basada en el tamaño queda confirmada.

Por ende los geles y las células son similares respecto de muchos atributos: estructuración del agua, resistencia al congelamiento, exclusión de solutos y consistencia física. La ciencia de los geles de polímero tendrá mucho para contribuir a la biología celular. Manténganse sintonizados.

CONCLUSIÓN

Con este capítulo empezamos a considerar el impacto del agua estructurada sobre la función celular. Los principios termodinámicos denotaron que los solutos deberían ser excluidos de la célula y que el grado de exclusión dependería principalmente del volumen del soluto. Esta expectativa fue confirmada. Y fue confirmada asimismo en el gel, lo cual conlleva muchas similitudes físico-químicas con la célula.

El comportamiento del soluto es explorado ulteriormente en el próximo capítulo. Vemos que la exclusión es aplicable no sólo a los no-electrolitos que estuvimos considerando, sino también a los iones. La exclusión de solutos será un factor fundamental en el particionamiento de iones entre el interior y el exterior de la célula.



CAPÍTULO 6: IONES

Los iones experimentan fuerzas que surgen a partir de su carga. Los iones positivamente cargados son atraídos hacia las cargas de superficie negativas de las proteínas, mientras que los iones negativos son atraídos hacia las cargas positivas de las proteínas. Los iones, por ende, podrían adsorber tal como las moscas se pegan al papel matamoscas. Si así fuera, el particionamiento entre el interior y el exterior de la célula se basaría no sólo en factores de solubilidad, sino también en la extensión de la adsorción a proteínas citoplasmáticas. Ambos de estos factores deben tenerse en cuenta para comprender la distribución iónica (Tabla 1.1) –un rasgo distintivo central para la función.

SOLUBILIDAD

En el capítulo previo hemos establecido que el factor capital subyaciendo a la solubilidad en la célula era el tamaño: cuando más grande el soluto, más baja la solubilidad en el agua estructurada. Si este paradigma se mantiene válido para solutos cargados también, entonces los iones más grandes deberían ser preferentemente excluidos de la célula. De inmediato veremos que esta expectativa se mantiene en el sentido general.

El establecer el tamaño iónico, sin embargo, no es meramente una cuestión de determinación de las dimensiones del ión desnudo. Esos valores son conocidos a partir de la cristalografía de rayos X: el sodio, por ejemplo, tiene un radio iónico cercano a los 0,95 Å, y el potasio, 1,33 Å. Pero las dimensiones del ión desnudo tienen poca importancia en solución acuosa porque el ión atrae una cubierta de agua estructurada, lo cual confiere la solubilidad. Se dice que ión tiene un diámetro “hidratado”, el cual puede exceder el diámetro del ión desnudo en una cantidad considerable.

La forma estándar de inferir el tamaño hidratado es a partir de la difusibilidad. En soluciones acuosas los solutos más pequeños difunden más rápidamente que los más grandes. Este hecho fue reconocido por Einstein, quien razonó que la alta movilidad de solutos debe estar basada en la baja fricción. Einstein aplicó la ley de fricción de Stoke y propuso la ahora famosa relación de Stoke-Einstein. Esta relación predice que el coeficiente de difusión de un soluto debería variar inversamente a su radio hidrodinámico. Por lo tanto, el tamaño podría determinarse a partir del coeficiente de difusión medido.

La aplicación de esta formulación arrojó resultados inesperados. Para el conjunto más pequeño de cationes, el diámetro hidratado y el diámetro del ión desnudo resultaron estar inversamente relacionados. Se dedujo que el diámetro hidratado del sodio era de alrededor de 5 Å, mientras que el del potasio era entre 3,6 y 4,0 Å. Este resultado contrario a lo intuible surge porque se sabe que el ión de sodio más compacto configura un campo eléctrico más fuerte, el cual atrae más capas de agua dipolar. La diferencia en el diámetro hidratado es sólo de alrededor de 25 -30 %, pero la diferencia de volumen resultante está calculada en aproximadamente el doble. Por ende, el sodio hidratado es dos veces más voluminoso que el potasio hidratado, y deberá por tanto sufrir una exclusión más profunda ejercida por el agua estructurada.

La exclusión relativa se aplica no sólo al sodio y al potasio sino también a todos los iones en la sucesión denominada Hofmeister o liotrópica. Sus miembros

biológicamente relevantes incluyen: $Mg^{2+} > Ca^{2+} > Na^+ > K^+ > Cl^- > NO_3^-$. Los iones hacia la izquierda poseen la intensidad de campo más alta –atraen el caparazón de agua estructurada más grande y son por ende clasificados como “promotores de estructura”. Aquellos iones hacia la derecha, a la inversa, son “rompedores de estructura”. Los iones se particionarán a agua cuyos enlaces de hidrógeno estén lo más fácilmente disponibles para satisfacer su antojo por la solubilización, siendo preferida el agua suelta frente a la estructurada porque se halla menos auto-asociada. El particionamiento hacia el agua suelta será el más pronunciado para iones que construyen las cubiertas de hidratación más grandes (Wiggins, 1990; Wiggins y van Ryn, 1990, Vogler, 1998). Por lo tanto, el Mg^{2+} y el Ca^{2+} rechazarán el agua estructurada, mientras que el Cl^- y el NO_3^- ingresarán más fácilmente.

Situados en algún lugar cerca del medio de este continuo se hallan el Na^+ y el K^+ . Sus posiciones contiguas, sin embargo, no implican necesariamente solubilidades comparables. El grado de hidratación cambia marcadamente con un tamaño iónico crítico donde las intensidades de las interacciones ión-agua y agua-agua son equivalentes. Para cationes monovalentes esto ocurre con un radio iónico de 1,06 Å (Washabaugh y Collins, 1986; Collins, 1995) – toscamente a mitad de camino entre el Na y el K. El tamaño de la cubierta de hidratación del sodio será entonces considerablemente más grande que el de la del potasio –precisamente como Einstein lo infirió- y su solubilidad será sustancialmente más baja.

Resulta tentador sugerir, por ello, que el motivo por el cual la concentración de sodio es tan baja adentro de la célula es debido a una baja solubilidad en el agua celular. El sodio podría simplemente particionar fuera del agua celular y hacia el agua suelta. Una demostración directa de esta tesis es brindarle sodio al citoplasma y observar la cantidad que ingresa. El experimento fue llevado a cabo (Ling, 1978).

Un músculo de sapo fue rebanado transversalmente –cortado como un salchichón (Fig. 6.1). El extremo cortado del músculo fue expuesto a una solución de sal que contenía iones del sodio marcados radiativamente. Para descartar cualquier intercambio iónico a través del límite membranoso, la superficie cilíndrica del músculo fue suspendida en aire o bañada con vaselina. Mediante la medición de la marca radiactiva acumulada dentro del músculo tras una exposición sustancial, la distribución entre el agua suelta y el agua celular pudo ser evaluada.

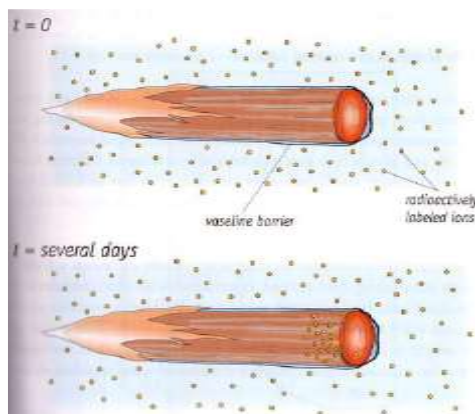


Figura 6.1. El extremo seccionado de un músculo es expuesto a un baño conteniendo el ión relevante. La tasa de difusión hacia dentro del músculo es medida.

A pesar de su alta concentración en la solución salina circundante, el sodio permaneció apreciablemente excluido del interior celular. La exclusión no pudo haberse debido al resellado porque ninguna membrana es regenerada (Cameron, 1988). En la zona justo por dentro del extremo cortado donde la injuria inducida por el cuchillo desbarató las proteínas de la célula, el sodio no fue excluido (Cf. Kushmerick y Podolsky, 1969). Pero varios centímetros más allá, donde el potencial de reposo permaneció normal y la naturaleza prístina del citoplasma no fue comprometida, el sodio fue excluido. Incluso luego de una exposición de varios días, la concentración de sodio continuó permaneciendo en un bajo valor de un 15 % del correspondiente a la solución externa –una proporción de partición de 0,15.

El sodio es excluido no sólo del citoplasma sino también, tal como hemos llegado a suponer, de los geles (Negendank, 1982). En geles de gelatina, dependiendo de la concentración de colágeno, los coeficientes de partición del sodio oscilaron entre 0,89 y 0,54; y en geles no biológicos conformados por una gama de polímeros de diferente tamaño, se descubrió que los coeficientes de partición eran tan bajos como lo es uno de 0,22 (Ling, 1992). Por lo tanto, el agua estructurada excluye al sodio tanto en la célula como en los geles.

Es instructivo comparar el grado de exclusión de sodio logrado a través del particionamiento (el experimento del extremo cortado) con aquel que es característico de la célula intacta. En el experimento del extremo cortado la proporción de partición adentro-afuera fue de 0,15, mientras que en la célula es típicamente de 0,10. Esta similitud le brinda peso a la tesis de que la baja concentración del sodio en la célula intacta podría ser explicable principalmente en base a una exclusión dependiente del tamaño.

ADSORCIÓN IÓNICA

Además de la solubilidad, un segundo factor que podría afectar la acumulación iónica adentro de la célula es la afinidad de la proteína. Muy similarmente al modo en que los dipolos de agua se adsorben a superficies protéicas, también pueden hacerlo los solutos cargados. Con la suficiente afinidad, los iones pegajosos podrían concentrarse con alguna abundancia.

El principio de afinidad iónica no es ni misterioso ni arcaico; es aprovechado en dispositivos cotidianos comunes tales como ablandadores de agua (Fig. 6.2). El ablandador es una resina llamada de intercambio iónico, un gel polimérico que “suaviza” el agua que pasa en virtud de su alta afinidad por los iones de metales pesados que de otro modo “endurecen” el agua. Un intercambiador de cationes típico se construirá con una resina negativamente cargada inicialmente cargada con sodio. Dado que la afinidad de la resina por el sodio es menor que aquella por los iones más pesados de potasio y calcio hallados en el agua, el gel perderá su sodio en el intercambio por estos cationes. La adsorción de cationes pesados ablanda el agua que pasa.

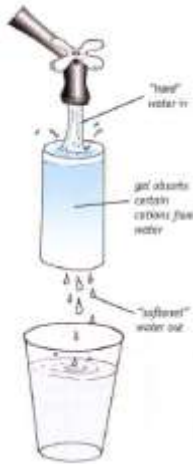


Figura 6.2. Principio del gel de intercambio iónico.

Esta capacidad para la adsorción iónica selectiva bien podría ser compartida por las proteínas –ya que las proteínas, después de todo, son polímeros biológicos. Consideren el experimento del extremo cortado. La Figura 6.3 muestra que la misma región de la célula que excluye al sodio en realidad acumula el potasio radiactivamente marcado. La concentración de potasio en lo profundo de la célula muscular es en última instancia de alrededor de tres veces el valor de la hallada en el baño de inmersión. Evidentemente, algo en el citoplasma acumula potasio mientras que excluye al sodio –una característica bastante similar a la del gel de intercambio iónico.

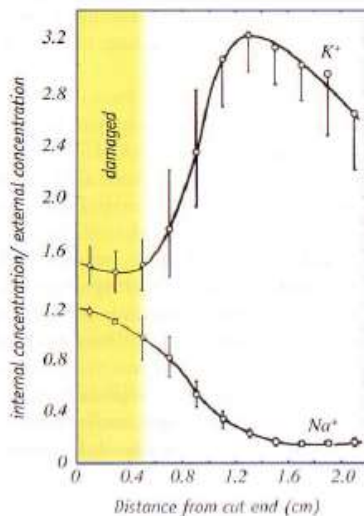


Figura 6.3. Resultados experimentales obtenidos utilizando la preparación del “extremo cortado” de músculo. Según Ling (1992). Ver el texto para una descripción. Los iones de sodio en el baño son excluidos del citoplasma, mientras que los iones de potasio se acumulan en una alta concentración

Para comprender el fundamento de la adsorción selectiva volvemos a las proteínas de la célula, cuyas superficies se hallan densamente recubiertas con carga. Los iones y los dipolos de agua compiten por estas cargas (Capítulo 4). Los sitios positivamente cargados atraerán iones negativos tales como el cloruro, y los sitios negativamente cargados atraerán el sodio y el potasio. Para que la adsorción se lleve a cabo, la cubierta de hidratación del ión debe ser removida. Despojar al sodio de su cubierta más grande requiere más energía que quitar la más pequeña del potasio. Por ende, la adsorción de potasio será favorecida por sobre la adsorción de sodio (Cf. Ling, 1952; Joseph *et al.*, 1961).

Las diferencias de adsorción-afinidad no sólo se aplican al potasio y al sodio sino también a todos los iones. Una vez más, estos siguen la sucesión de Hofmeister. Los iones a la izquierda adsorben pobremente porque sus cubiertas de hidratación son las más grandes; los iones a la derecha adsorben más fácilmente porque sus cubiertas son las más pequeñas. Por lo tanto, el Mg²⁺ y el Ca²⁺ serán comúnmente desplazados por el Na⁺, el cual es

desplazado por el K^+ . La situación difiere, sin embargo, cuando las superficies a las cuales estos iones se ligan se hallan cercanamente yuxtapuestas. Las superficies negativamente cargadas en cercana proximidad mutua pueden ser fácilmente unidas mediante enlace cruzado por cationes divalentes tales como el Ca^{2+} , confiriendo a estos iones una afinidad anómalamente alta. El interjuego entre divalentes y monovalentes en superficies aniónicas cercanamente situadas tendrá un papel central en la dinámica intracelular (Capítulos 9 y 10). Para superficies poliméricas cargadas comunes, sin embargo, el resultado final es que entre cationes biológicamente relevantes, el K^+ adsorbe más potentemente.

Para determinar cuanto potasio pueden adsorber las proteínas de la célula, consideremos las cifras. La concentración de carga superficial negativa adentro de la célula se calcula ser de alrededor de 1,6 M (Wiggins, 1990). La concentración de potasio es típicamente de 0,15 M. Por ende, la cantidad de cargas superficiales negativas supera a la de iones de potasio por diez veces. Aun si el 90% de los sitios de carga fijados estuviesen ocupados por dipolos de agua, abundantes sitios permanecerían disponibles para acomodar a cada uno de los iones de potasio de la célula (así como a otros iones menos abundantes). La capacidad para la adsorción iónica es sorprendentemente alta.

EVIDENCIA DE LA ADSORCIÓN DE POTASIO

Ver si semejante capacidad teórica se traduce en una real adsorción requiere echar una mirada en la evidencia existente. Pese a que el experimento del extremo cortado sugiere una apreciable magnitud de ligadura de potasio, y se informa una muy baja tasa de difusión de potasio (Ling y Ochsenfeld, 1973), uno precisa determinar si tales resultados son representativos del más extenso espectro de evidencias.

La primera evidencia que viene a la mente es el experimento del derrame de potasio (Capítulo 3). Luego de la disolución de la membrana, recordemos que el potasio no se filtró hacia fuera de la célula hasta transcurrido un lapso de tiempo significativo, y cuando finalmente sí escapó, lo hizo junto con las proteínas celulares (Kellermayer *et al.*, 1994): entre un espectro de condiciones experimentales que arrojaron una escala de tasas de filtración de potasio veinte veces mayores, las tasas de derrame de proteína y potasio permanecieron consistentemente iguales. Esto confirmó el enlace entre proteína y catión.

Un segundo experimento que considera el tema de la adsorción de potasio utiliza una ingeniosa técnica de "gotita ácuea" (Maughan y Recchia, 1985). En este acercamiento se deposita una pequeña gotita de agua pura sobre la superficie de una célula muscular demembrada. La gotita forma un reservorio hacia dentro del cual los iones intracelulares difusibles pueden particionar (Fig. 6.4). A partir del particionamiento observado, los investigadores concluyeron que un 52% del potasio de la célula fue ligado. El porcentaje de ligadura real podría ser incluso más alto que el 52% porque parte del potasio fue probablemente atraído desde los amplios espacios de difusión libre que se abren típicamente entre las miofibrillas celulares durante el demembrado.

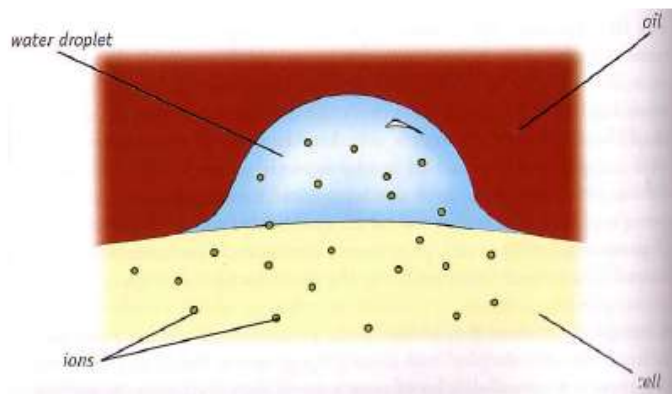


Figura 6.4. Técnica de la gotita acuosa. Los iones libres dentro de la célula difunden hacia la gotita hasta que se establece un equilibrio.

Un tercer tipo de experimento se centra en la forma en que el potasio se distribuye dentro de la célula. Si las superficies proteicas adsorben potasio, las regiones con alto contenido proteico deberían ser ricas en potasio, mientras que las regiones con deficiencia proteica deberían ser pobres en potasio. Esta predicción ha sido estudiada y confirmada una y otra vez por el biofísico alemán Ludwig Edelman y otros, utilizando una diversidad de acercamientos diferentes. Resumidos más abajo, estos experimentos fueron conducidos sobre células musculares, donde la alternancia de bandas A e I (Fig. 3.2) provee zonas naturales de densidad proteica alta y baja que son convenientes para comprobar la predicción.

Un enfoque involucró el microanálisis de rayos X. Este método localiza átomos relativos a las organelas celulares mediante el aprovechamiento del perfil de dispersión energética distintivo de cada átomo. Se constató un mayor contenido de potasio en la banda A que en la I (Edelman, 1978; Trombitás y Tigy-Sebes, 1979). Esta diferencia fue reconfirmada más adelante (Edelman, 1983) en un experimento que también mostró que podía obtenerse un resultado engañoso si la línea Z rica en potasio, la cual bisecta a la banda I, era incluida en la muestra (Cf. Somlyo *et al.*, 1981). Cuando la línea Z es adecuadamente excluida, los resultados del microanálisis, incluyendo experimentos de seguimiento en otro laboratorio (von Zglinicki, 1988), confirman uniformemente un contenido de potasio más alto en la banda A que en la banda I. El potasio se concentra donde se concentra la proteína.

Otro enfoque se basó en la espectrometría de masa (Edelman, 1980). El primer paso fue preparar una sección para micrografía electrónica de músculo. Luego, un rayo láser vaporizó regiones seleccionadas de la sección y los iones vaporizados fueron analizados cuantitativamente mediante el espectrómetro de masa. A este acercamiento general se lo denomina con el apropiado acrónimo AMMSL, o análisis de masa por microsonda láser. Al igual que los resultados del microanálisis de rayos X, los resultados del AMMSL mostraron una mayor acumulación de potasio en la banda A que en la banda I.

Los resultados del AMMSL confirmaron una fuerte preferencia de enlace del potasio por sobre el sodio. Inclusive cuando la solución de baño contenía una concentración de potasio diez veces menor que la de sodio, la acumulación de potasio en la banda A siguió excediendo a la del sodio, por un factor de dos. Estas cifras implican una preferencia de potasio-a-sodio del orden de 20:1, lo cual es similar a la proporción en la célula viviente.

Aún otro enfoque atrapa iones en su lugar mediante congelamiento rápido, y los localiza a través de la microscopía electrónica (Edelman, 1978). Las estructuras observadas en el microscopio electrónico son habitualmente

visualizables porque se hallan teñidas con metales pesados, los cuales son buenos dispersantes de electrones. Cuando los metales pesados son omitidos, las estructuras observables surgen a partir de la dispersión por parte de los elementos naturalmente disponibles –aquí principalmente el potasio. El potasio tiñó la banda A pero no la banda I. La acumulación selectiva en la banda A fue demostrada incluso más claramente cuando el potasio fue reemplazado por sus sucedáneos tales como el cesio, el talio o el rubidio, los cuales son dispersantes superiores en virtud de su peso incrementado; con estos sucedáneos, la preferencia de la banda A por sobre la banda I fue dramática (Edelmann, 1978).

Este conjunto de experimentos confirma que el potasio es concentrado donde se concentran las proteínas. Ellos exhiben una co-localización. El resultado es contrario al que puede predecirse si el potasio estuviera disuelto, porque las regiones con densidad proteica contienen relativamente menos espacio solvente y deberían por tanto haber tenido menos potasios, no más potasios. El vínculo entre proteína y potasio es respaldado asimismo por los resultados anteriormente citados en esta sección: el experimento de la gotita ácuea; el experimento de la disrupción de membrana; y el experimento del extremo cortado. Todos implican que el potasio es en gran parte adsorbido a las superficies proteicas.

CONCLUSIÓN

En este capítulo consideramos los motivos por los que el citoplasma contiene alto potasio y bajo sodio. Hallamos que la diferencia surge directamente a partir de la química física de estos iones en relación al agua y las proteínas de la célula (Fig. 6.5).

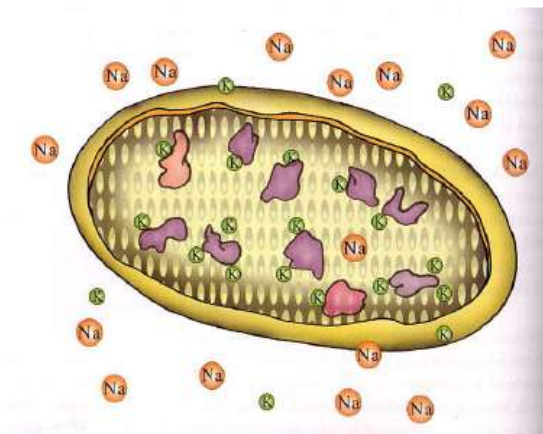


Figura 6.5. Resumen del mecanismo de partición iónica. Las proteínas de la célula ligan al potasio preferentemente, y el agua celular excluye al sodio preferentemente.

El agua celular excluye a los iones porque está estructurada. La exclusión es más pronunciada para el sodio que para el potasio porque la cubierta de hidratación del sodio es más grande y por ende más difícil de acomodar en el enrejado del agua estructurada. Por lo tanto, la concentración de sodio intracelular permanece baja mientras que el potasio puede particionar más fácilmente hacia dentro del citoplasma.

Un segundo sitio discriminativo es la proteína, cuyas cargas superficiales proveen sitios de adsorción para los iones. Estos iones incluyen al Cl^- (Capítulo 7) como también a cationes tales como el Na^+ y el K^+ . El potasio es adsorbido más fácilmente que el sodio porque su cubierta de hidratación más pequeña puede ser removida con un gasto de energía relativamente menor. De este modo puede concentrarse adentro de la célula.

Un rasgo distintivo principal de este mecanismo de particionamiento es que el sistema se halla en equilibrio. No se requiere energía alguna para el mantenimiento. No se precisan artilugios especiales para mantener el potasio adentro de la célula o el sodio afuera de la célula –todo esto deriva directamente de los rasgos distintivos físico-químicos básicos del citoplasma.



Dr. Megavolt, 2000, por el Dr. Austin Richards

CAPÍTULO 7: POTENCIALES CELULARES

Originalmente entrenado en ingeniería eléctrica, me quedé atónito al saber en mi primera clase de fisiología que los mismísimos gradientes de cargas y de potencial que impulsaban los motores de inducción, rodeaban las líneas de alta tensión, y aislaban los empalmes de semiconductores también impregnaban a la célula viviente. Después de todo, la ley de Gauss pudo mantener una relevancia inmediata. El encanto de esta revelación aún puede evaporarse.

La existencia de una diferencia de potencial entre el interior y el exterior de una célula fue inferida hace más de 150 años cuando Matteucci interpuso un galvanómetro entre la superficie muscular y un corte en la barriga del músculo, detectando así un potencial de "injuria". Pero fue Gilbert Ling, el mismo Ling cuyo trabajo he estado citando en estos capítulos, el actor crucial en la medición del verdadero potencial intracelular. Ling recién había llegado desde China, un joven becario brillante elegido entre muchos candidatos adjudicándose una Beca Boxer para estudiar en EE.UU. Aterrizando en el laboratorio del prominente fisiólogo Ralph Gerard, Ling perfeccionó el microelectrodo de vidrio, un capilar de vidrio templado relleno con una solución, que podía ser clavado dentro de una célula para investigar la diferencia de potencial entre el interior y el exterior. A partir de este simple invento, se desarrollaron virtualmente todos los conceptos modernos sobre electrofisiología celular, incluyendo el método del parche-abrazadera, hoy ampliamente utilizado para el estudio de las corrientes de membrana, el cual endilgó a sus promotores un Premio Nobel.

La electrofisiología celular es el tema de este capítulo, particularmente la génesis del potencial celular. Como veremos, el potencial de la célula surge inevitable y naturalmente a partir de los rasgos distintivos físicos del citoplasma.

CARGA

La propuesta de que el citoplasma en sí mismo podría tener relevancia en la creación del potencial celular no carece de apuntalamiento experimental. Potenciales de magnitud apreciable se ven en especímenes demembrados (Naylor y Merrillees, 1964; Weiss *et al.*, 1967; Miller, 1979; Collins y Edwards, 1971; Stephenson *et al.*, 1981; Bartels y Elliott, 1985; Naylor *et al.*, 1985). También se los ve en suspensiones coloidales (Troshin, 1948). Y han sido constatados en geles (Collins y Edwards, 1971). Dado que ninguno de estos especímenes contiene una membrana funcional, la diferencia de potencial medida entre el interior y el exterior deberán surgir a partir de las propiedades del volumen del gel/citoplasma por sí mismo.

La existencia de semejantes potenciales de gel/citoplasma es bien reconocida y su presencia es generalmente atribuida a un mecanismo "Donnan". En otras palabras, se piensa que surgen a partir de una interacción entre las cargas fijas de las proteínas y las cargas móviles de los iones. Independientemente del mecanismo, el punto es que los especímenes desprovistos de una membrana y estudiados incluso bajo condiciones bastante arbitrarias pueden manifestar potenciales de hasta 50 mV (Collins y Edwards, 1971).

Nuestro acercamiento a un mecanismo circunvala el formalismo del mecanismo de Donnan (Cf. Overbeek, 1956), el cual es aplicable específicamente a iones *móviles*. Consideramos en lugar de ello lo que resulta en situaciones en las cuales los iones se hallan en gran parte adsorbidos a proteínas (Capítulo 6).

Consideremos primero la magnitud de carga aportada por los actores relevantes. La carga de proteína total puede ser estimada mediante un cálculo a primera vista. Al saber el contenido fraccional de cada aminoácido (sorprendentemente uniforme a través de las proteínas), y la carga, junto con la masa promedio del aminoácido (126,4 Dalton), uno puede estimar la carga por unidad de masa proteica. Por cada kilogramo de proteína la cifra de de 1,6 mol de carga negativa y 1,01 mol de carga positiva (Wiggins, 1990). Por ende, las proteínas de células típicas portan un exceso de carga negativa de alrededor de 0,6 mol/Kg. Una carga negativa adicional proviene de las glicoproteínas, los ácidos nucleicos y otros constituyentes no proteicos, pero su contribución es inconsecuente porque sus cantidades son relativamente más pequeñas.

Comparemos esta carga negativa en exceso con la carga portada por los iones de la célula. La concentración de iones positivamente cargados, principalmente potasio, es de alrededor de 160 mM. Con un contenido de agua celular de 3 Kg. /Kg. de peso seco de proteína, esta cifra se traduce a aproximadamente 0,5 moles de potasio por Kg. de proteína seca. Esta carga positiva es contrarrestada parcialmente por los iones negativamente cargados, principalmente el cloruro, a 0,2 moles por Kg. Por ende, los iones celulares, en gran parte potasio y cloruro, presentan una carga positiva neta (0,3 mol/Kg.). Esto no es suficiente para equilibrar el exceso de carga negativa de las proteínas (0,6 mol/Kg.). El citoplasma, según este cálculo, permanece negativamente cargado (Fig. 7.1).

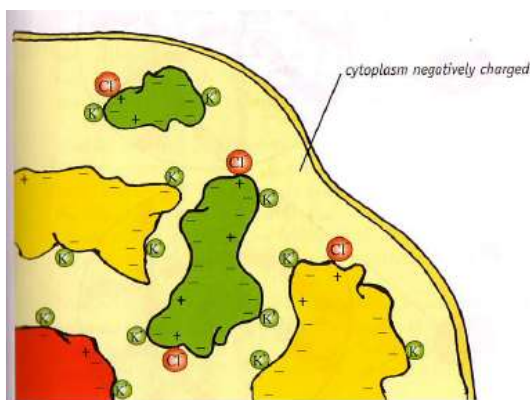


Figura 7.1. Nivel de carga del citoplasma. Debido a que las cargas catiónicas no equilibran a las cargas proteicas, el citoplasma permanece negativamente cargado.

Para entender la consecuencia de esta carga neta, imaginen una red de proteína inicialmente desprovista del todo de agua o iones (Fig. 7.2). Ahora agreguen moléculas de agua. Debido a su atracción a las cargas superficiales de las proteínas, los dipolos de agua vecinos se adsorberán, orientándose a sí mismos en capas sobre capas por sobre la superficie proteica. El influjo continuará hasta que se agote el potencial de atracción de las proteínas –o puesto de otra forma, hasta que la energía libre del sistema haya alcanzado un mínimo. A esta altura la matriz se hallará completamente hidratada –bastante similarmente a un gel hidratado.

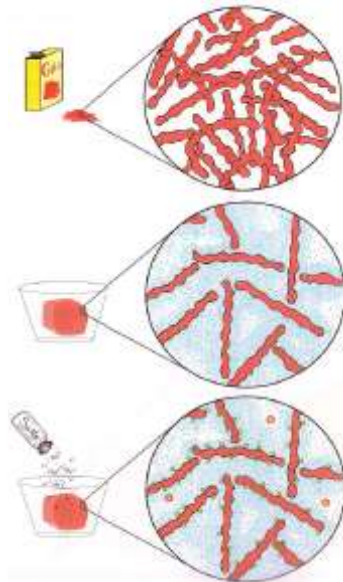


Figura 7.2. Red proteica hipotética (arriba). La inmersión en agua hidrata la proteína llevándola a un estado de gel. La adición de sal resulta en la adsorción iónica.

Luego, agreguen iones. Sumerjan el gel de proteína en un baño conteniendo concentraciones fisiológicas de NaCl y KCl, omitiendo iones de menor significancia cuantitativa para mantener la cuestión simple. Los iones de sodio permanecerán en gran parte excluidos debido a su baja solubilidad en agua estructurada. Los iones de potasio, siendo más solubles, penetrarán; y a causa de su alta afinidad por proteína podrían desplazar al agua adsorbida, aferrándose a la superficie de la proteína en una alta concentración. El cloruro, estando cargado negativamente, evitará el medioambiente negativamente cargado de la matriz y permanecerá en gran parte excluido.

Nada es particularmente asombroso en este escenario –todos los elementos se deducen a partir de los capítulos previos. Pero existe un nuevo rasgo distintivo cuantitativo. Si esta hipotética matriz proteica se asemeja a la que está dentro de la célula, la cantidad de potasio que es capaz de particionar hacia el interior del sistema será insuficiente como para neutralizar la totalidad del exceso de carga negativa de la proteína; la matriz permanecerá negativamente cargada.

Ahora, claven un microelectrodo dentro de esta matriz gelatinosa. Dado el exceso de carga negativa, el microelectrodo debería registrar un potencial negativo, y ello es precisamente lo que se ve. Los microelectrodos introducidos dentro de geles aniónicos o de células demembrados rutinariamente informan potenciales negativos en relación con el exterior (ver más arriba). Un ejemplo reciente, que me fue proporcionado por el Profesor Rainer Gülch, es ilustrado en la Figura 7.3. Éste confirma potenciales de gel del orden de los 100 mV o más.

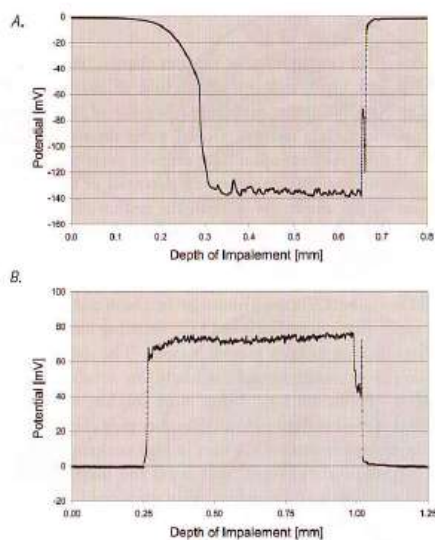


Figura 7.3. Microelectrodos repletos de KCl clavados dentro de tiras de gel a una velocidad baja constante y luego retirados. A: Un típico gel aniónico de poliacrilamida/polipotasioacrilato muestra un potencial negativo. B: Un típico gel catiónico de poliacrilamida/polidialidimetilcloruro de amonio muestra un potencial positivo. Cortesía de R. Gülch.

Si los potenciales negativos surgen a partir de la carga negativa en exceso, entonces carga y potencial citoplasmático/gel deberían ir mano a mano; los agentes que afectan a la carga de la matriz deberían afectar al potencial de forma similar. Consideren el efecto de la sal. Cuando la concentración de KCl en el baño es disminuída, menos iones de potasio se hallan disponibles para difundir hacia dentro de la matriz proteica. La matriz estará por eso menos neutralizada. Con más carga fijada residual, la magnitud del potencial debería aumentar. Inversamente, si la concentración de sal es incrementada, las cargas de las proteínas se hallarán más completamente neutralizadas y la magnitud del potencial debería disminuir hacia el cero. Estas expectativas están confirmadas –no sólo en el citoplasma desnudo sino similarmente en geles (Collins y Edwards, 1971; Stephenson *et al.*, 1971).

POTENCIAL CELULAR

Ahora nos movemos desde el citoplasma hacia la célula. Habiendo establecido que el citoplasma posee una carga neta y un correspondiente potencial, consideramos si es que esta carga y este potencial son los mismos en la célula intacta (Ling, 1955). Contemplamos la posibilidad, en otras palabras, de que la membrana sea eléctricamente inconsecuente, como lo implican los anteriores capítulos.

Para comprobar esta expectativa, uno puede comparar el potencial citoplasmático con el potencial de la célula entera. Esto no es exactamente una simple cuestión de despojar a la célula de su membrana y medir el voltaje antes y después: la solución escogida para bañar el citoplasma expuesto necesita ser ajustada como para imitar la “solución” que rodea naturalmente a las proteínas citoplasmáticas; de otro modo, el baño puede impactar el medio intracelular y comprometer la comparación. No obstante, la cifra “aficionada” de 50 mV antes citada para el potencial citoplasmático no está alejada del potencial celular. Y el potencial citoplasmático medido en el experimento del “extremo cortado” donde la membrana es funcionalmente eliminada es aproximadamente el mismo que el potencial medido cuando la célula está intacta (Ling, 1988).

Una prueba adicional es comparar los potenciales celulares y citoplasmáticos en situaciones en las cuales la carga citoplasmática es alterada –los dos potenciales deberían variar similarmente si la membrana es electrofisiológicamente transparente. Tomamos en cuenta alteraciones de

carga mediadas por cambios en el contenido iónico, y luego mediante el contenido de proteína.

El efecto del potasio ya ha sido considerado. Mediante su adsorción a la carga de superficie negativa de la proteína, los iones de potasio disminuyen la carga citoplasmática neta y reducen el potencial citoplasmático. El potencial celular es disminuido correspondientemente: como el potasio intracelular es elevado por el creciente potasio extracelular, el potencial celular disminuye (Fig. 7.4).

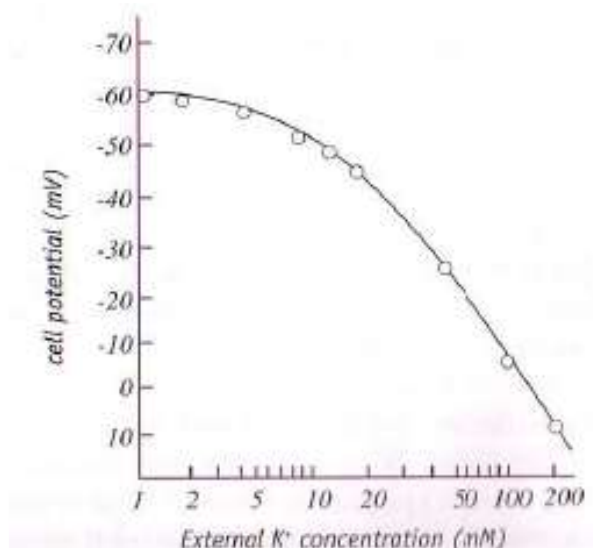


Figura 7.4. Efecto de la variación de potasio extracelular sobre el potencial celular. Según Ling (1992).

En cuanto al sodio, se prevé poco o ningún efecto. A causa de su exclusión del citoplasma, el poder de neutralización del sodio es enclenque, por lo que cualquier cambio de la concentración de sodio externa debería en gran parte pasar desapercibido para el citoplasma. En la célula intacta, los experimentos muestran una insensibilidad similar. El decremento de la concentración de sodio externa desde su nivel característicamente alto hacia el cero no tiene prácticamente efecto alguno sobre el potencial celular medido (Hodgkin y Katz, 1949; Draper y Weidmann, 1951).

Finalmente, consideren los iones de cloruro. Debido a su carga negativa, el cloruro y otros aniones están comúnmente en una concentración muy baja adentro del citoplasma. El cloruro es, por ello, un colaborador menor para con el potencial citoplasmático. Sus efectos sobre el potencial celular son similarmente insignificantes. Los cambios del cloruro externo median sólo efectos transitorios, permaneciendo inalterado el potencial del estado de reposo (Hodgkin y Horowicz, 1959).

Otra manera de variar la carga citoplasmático es a través de la variación de la carga de la proteína. Las proteínas conteniendo menos carga negativa neta deberían dar surgimiento a un potencial citoplasmático más pequeño y a un potencial celular predeciblemente más pequeño (Fig. 7.5). Habitualmente, esta predicción sería difícil de comprobar porque la disposición de la proteína celular es compleja, y no es fácil contabilizar la carga neta de un tipo de célula y compararla con otro. Aún pese a que el potencial celular varía ampliamente entre diferentes tipos celulares (entre ca. -10 mV y -100 mV), el cómputo de las respectivas cargas proteicas no resulta sencillo. Pero hay una excepción.

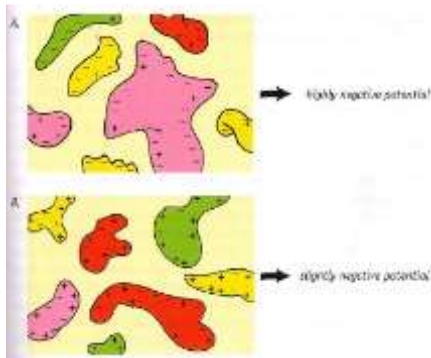


Figura 7.5. (A) Carga negativa alta sobre proteínas. (B) La abundancia de residuos positivos conduce a una baja carga negativa neta.

La excepción es la célula del glóbulo rojo cuyo citoplasma se halla dominado por una única proteína, la hemoglobina. La hemoglobina, a su vez, es justamente atípica en cuanto a su alta densidad de residuos de lisina e histidina positivamente cargados. La carga neta de la hemoglobina es por ello sólo ligeramente negativa, en comparación con, digamos, la miosina o la actina cuya carga neta es altamente negativa. Bajo condiciones fisiológicas normales entonces, el potencial citoplasmático del eritrocito se predice ser sólo marginalmente negativo, mucho menos que otras células que hemos estado considerando. Efectivamente, los potenciales eritrocitarios experimentalmente medidos son típicamente de solo - 10 mV (Ruch y Patton, 1965) comparados con los - 70 a - 90 mV hallados en la mayoría de células musculares.

En suma, si la carga es introducida por el agregado de cationes o la adición de residuos positivos, el efecto es el mismo: la carga positiva reduce el (negativo) potencial citoplasmático y el potencial celular de la misma manera. El potencial celular puede derivar exclusivamente del exceso de carga negativa del citoplasma.

Los lectores con formación fisiológica estarán preguntándose cómo un mecanismo tan simple como este podría posiblemente llegar a producir un potencial de acción –la espiga de voltaje de dirección positiva característica de las células excitables. El potencial de acción es un tema de una importancia tal que consumirá un capítulo entero (Capítulo 10). Baste con decir que no obstante una magnitud pequeña, los potenciales de acción pueden ser obtenidos desde células completamente despojadas de sus membranas (Natori, 1975); la membrana no es requerida. Importantes oscilaciones de potencial pueden por otro lado surgir a partir de cambios estructurales en el seno del citoplasma: Por ejemplo, entre regiones disueltas y gelificadas de amebas se observan diferencias de potencial del orden de 40 mV (Bingley, 1966). Como veremos más adelante, los cambios estructurales citoplasmáticos jugarán un rol central en la génesis del potencial de acción.

NUEVA VISITA A LAS MEMBRANAS AGUJERADAS

Finalmente, cerramos el bucle mediante la revisión de un tema que previamente pareció ser paradójico –la preocupación respecto de los esperados estragos de la disrupción de la membrana, la cual resultó siendo infundada (Capítulo 2). Llenar la membrana de agujeros acribillándola con pistola, daga o espada no condujo inexorablemente a la muerte celular. La célula pudo sobrevivir, y el potencial eléctrico no fue afectado.

Ahora entendemos mejor por qué. Si las propiedades esenciales de la célula, incluyendo su carga y su potencial eléctrico, surgen a partir de la mayoría de

propiedades del citoplasma, el quebrantamiento de la membrana debería ser relativamente inconsecuente.

Así como el humano sobrevive a un desgarrón en su piel, la célula sobrevive a un desgarrón en su membrana.

CONCLUSIÓN

Este capítulo finaliza la segunda sección del libro. Para aquellos lectores que deseen hurgar más profundamente en estos conceptos, les recomiendo los trabajos de Troshin, Szent-Györgyi y Ling. El libro de Troshin (1966) brinda un relato especialmente legible sobre el particionamiento de solutos. El tomo escrito por Szent-Györgyi (1972) es más filosófico, ofreciendo un breve pero maravilloso relato sobre la significancia del agua estructurada para la vida. Los libros de Ling (1962, 1984, 1992) son exhaustivos y se centran mucho más profundamente de lo que yo pude sobre la estructura del agua, la adsorción iónica, los potenciales celulares y los temas relacionados. El libro de 1992 también reflexiona sobre el motivo por el cual el tipo de evidencias presentadas en varios de los capítulos previos ha sido ignorado. A pesar de que los enfoques de estos tres científicos difieren del mío en algunos aspectos, las similitudes son legión. Es más, es sobre los hombros de semejantes gigantes que este trabajo se erige.

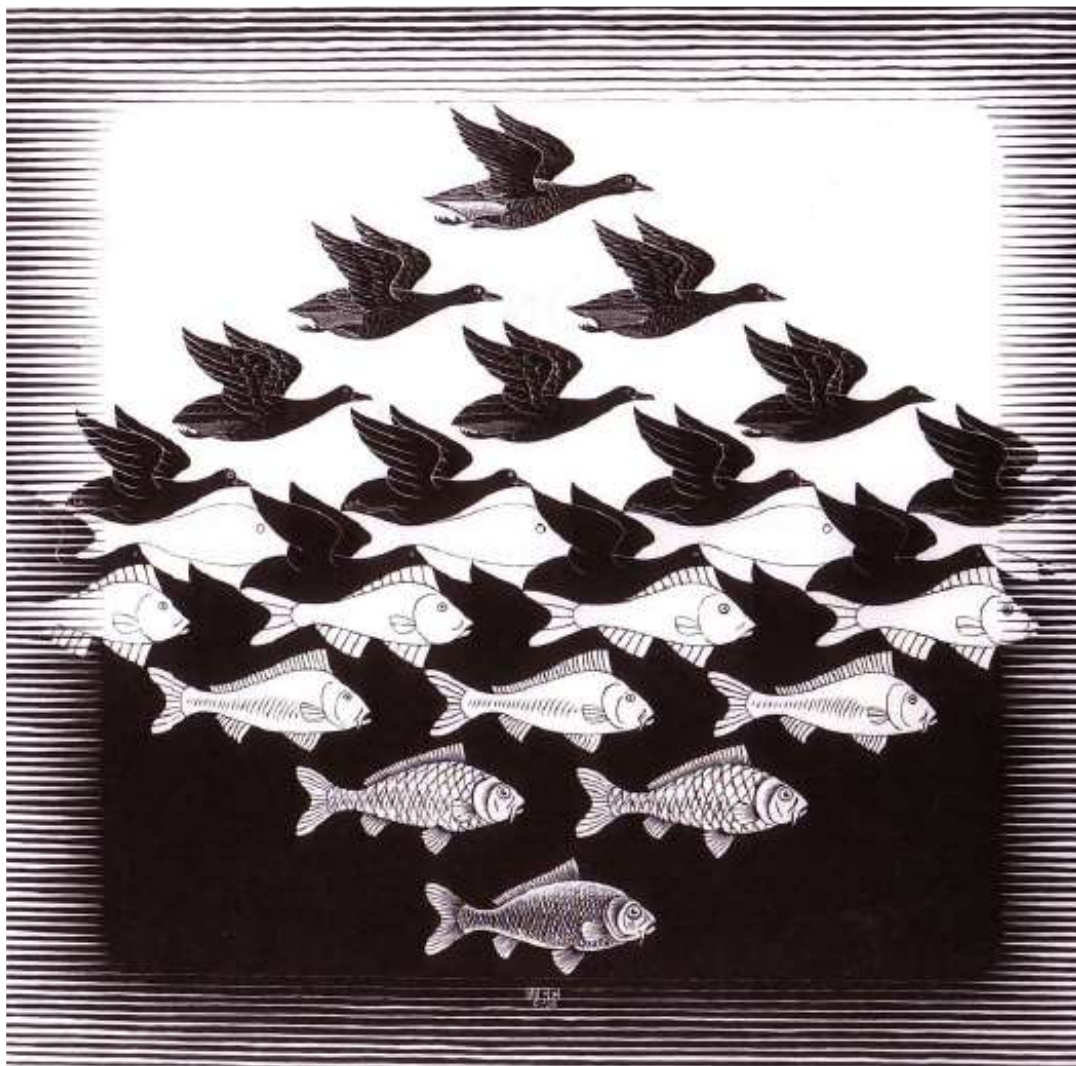
De más está decir que el paradigma propuesto aquí es ortogonal a la convención –de una diferencia enorme respecto de las visiones vigentes las cuales sitúan la mayor parte de la acción en la membrana en vez de en el citoplasma. Para apreciar el sabor total de la diferencia, nuevamente les recomiendo textos tales como los de Alberts et al. (1994) y también Hille (1992). La comparación de explicaciones del potencial celular provee una excelente base para la evaluación de los respectivos méritos de los dos enfoques.

En la próxima sección el paradigma fundacional que hemos esbozado salta a la vida mientras exploramos cómo la célula lleva a cabo sus tareas funcionales.

SECCIÓN III

UNA HIPÓTESIS PARA LA FUNCIÓN CELULAR

Cimentada en los capítulos previos, esta sección propone la hipótesis de que la función celular se parece a la función de un gel. Examina el rol central de la transición de fase en geles, y contempla el potencial para un rol similar en células.



Cielo y Agua I, 1938, por M.C. Escher

CAPÍTULO 8: TRANSICIÓN DE FASE: UN MECANISMO PARA LA ACCIÓN

Las células no permanecen detenidas –tienen tareas que realizar. Las células fabrican sustancias y transportan esas sustancias de un lugar a otro. Reaccionan ante estímulos. De vez en cuando pueden también dividirse. Y las células especializadas se mueven, emiten señales, secretan, se contraen... Y la lista continúa.

Sin estas tareas tan diversas fuesen mediadas por mecanismos igualmente diversos, las probabilidades de afianzar nuestra comprensión al respecto en el espacio de unos pocos capítulos serían similares a la probabilidad de dominar los lenguajes de todo el planeta en un día. Por el otro lado, si llegase a existir un común denominador para la función, entonces las probabilidades podrían caer dentro de la esfera de lo posible.

Los paradigmas comunes son en efecto aplicables a todo otro lugar en la naturaleza. En el campo de la genética, por ejemplo, el paradigma vigente es la doble hélice, cuya simplicidad esencial ha nucleado sorprendentes productos derivados, tanto prácticos como científicos. En el campo de la física, la búsqueda de un paradigma unificado respecto de las fuerzas iniciada por Einstein continúa hasta hoy en día. Semejantes búsquedas son impulsadas por la noción de la parsimonia –la presunción de que una vez que el principio subyacente adecuado se haya identificado, un conjunto de fenómenos en apariencia complejos serán sencillamente explicables. Es esta búsqueda de simplicidad lo que impulsa la pesquisa en pos de un paradigma en común para la acción celular.

El marco de nuestra indagación radica en la similitud del citoplasma para con un gel polimérico. La correspondencia físico-química ha sido documentada en los capítulos previos: ambas entidades están construidas por polímeros vinculados mediante enlaces cruzados; ambas contienen agua estructurada; ambas excluyen solutos; ambas exhiben potenciales eléctricos de magnitudes considerables; y ambas poseen la inefable “sensación” de un gel. Reconociendo esta correspondencia, tratamos a la célula como a un gel y nos preguntamos si tal enfoque puede llevarnos hacia un paradigma integrador de la acción celular.

LA ACTIVIDAD DEL GEL

Entonces, ¿cómo actúan los geles? Hasta ahora, el gel viene siendo tratado como una masa autista carente de sensibilidad característica alguna. Sin embargo, los geles son típicamente esquizofrénicos: de forma bastante similar a como el agua puede cambiar de estado de sólido a líquido, los geles pueden sufrir transformaciones igualmente notables. Una masa tipo gelatina Royal puede transformarse en un líquido. Un flexible gel repleto de agua puede contraerse hasta una masa seca, fuertemente condensada. Los respectivos estados a menudo presentan poco más parecido mutuo que el existente entre el agua y el hielo. Además, la transformación entre un estado hacia el otro puede ser mediada por nada más que un sutil cambio del ambiente (Fig. 8.1).

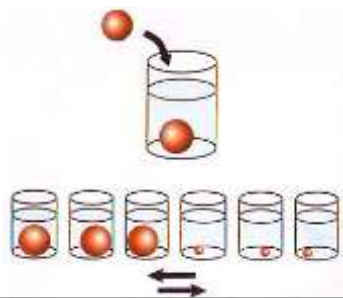


Figura 8.1. Las transiciones de fase son disparadas por sutiles cambios del medioambiente. Según Tanaka *et al.* (1992)

temperatura, composición del solvente, pH, iones, campo eléctrico, radiación UV, luz, moléculas específicas o sustancias químicas

Semejantes transformaciones son denominadas transiciones de fase debido a su naturaleza masiva y porque pueden ser disparadas por un pequeño cambio medioambiental, de forma bastante parecida a la transición agua-hielo. Un ejemplo es ilustrado en la Figura 8.2. Aquí la transición es inducida por un viraje de la proporción de solución acuosa orgánica. Cuando la proporción apenas cruza un umbral, el volumen del gel cambia en dos órdenes de magnitud. Desde el descubrimiento de la transición de fase varias décadas atrás realizado por el difunto Toyochi Tanaka del MIT (Massachusetts Institute of Technology), basado en la predicción teórica de Dusek y Patterson (1968), las transiciones de fase han sido aprovechadas por químicos e ingenieros para aplicaciones prácticas abarcando desde pañales descartables hasta sensores y músculos artificiales. Las transiciones de fase son el principal vehículo para la acción de los geles poliméricos.

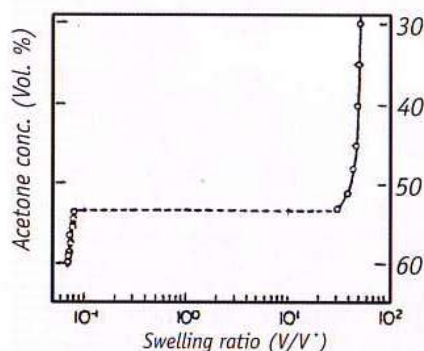


Figura 8.2. Efecto del cambio en la composición del solvente sobre el volumen del gel. Según Tanaka *et al.* (1992).

Para apreciar el alcance de las potencialidades de la transición de fase, consideren la Tabla 8.1, confeccionada originalmente por el Profesor Allan Hoffman, una luminaria del campo de los geles poliméricos. La tabla revela dos rasgos distintivos notables. El primero es la diversidad de agentes disparadores (panel izquierdo). Estos incluyen el cambio de pH, el cambio en la temperatura, los agentes químicos, la fuerza mecánica –agentes que se hallan entre los efectores de la acción celular más típicos. El segundo es la selección de respuestas (panel derecho). Muchas de éstas, incluyendo cambios de forma, volumen, permeabilidad y potencial eléctrico son nuevamente justamente los tipos de acciones que la célula emplea para mediar su función.

Si la célula en efecto posee un común denominador de la función, entonces, la transición de fase es un candidato digno de tener en cuenta. El tema de las transiciones de fase consumirá nuestra atención durante el resto de este libro mientras exploramos procesos celulares esenciales y vemos si la transición de fase provee una explicación adecuada. En este capítulo creamos el marco. Contemplamos los rasgos distintivos básicos de la transición de fase conjuntamente con unos pocos ejemplos representativos.

LO BÁSICO SOBRE TRANSICIÓN EN GEL

La estructura del gel es la matriz de polímero. La matriz es creada por largas hebras poliméricas típicamente unidas entre sí mediante enlaces cruzados ya sea química o físicamente. Los enlaces cruzados químicos tienden a ser estables con el calor, pH y composición del solvente, y comúnmente no experimentan transición. Los enlaces cruzados físicos están conformados por interacciones intermoleculares de tipos tales como coulómbicas, dipolo-dipolo, van der Waals e hidrofóbicas, las cuales atraen y juntan entre sí a las regiones moleculares que rehúyen al agua, o mediante enlazamiento de hidrógeno. Tales enlaces son por norma susceptibles a influencia medioambiental y tienden a la disrupción –conduciendo hacia transiciones estructurales.

Los intersticios de la red de polímero contienen solvente. La cantidad de solvente es determinada en gran parte por la superficie del polímero. Si la superficie es hidrofóbica, organizará una red de agua de clatrato (Capítulo 4). Si la superficie es hidrofílica como en la mayoría de polímeros biológicos, atraerá agua: el agua adherente atraerá a su vez capas adicionales de agua, y así sucesivamente. Para la determinación del grado de estratificación, el principal factor parece ser la densidad de sitios (Lewis) cargados: las superficies con más sitios cargados estructurarán más agua, mientras que las superficies con menor cantidad de sitios estructurarán menos. Se sabe que las superficies altamente cargadas alcanzan a estructurar hasta 600 capas de agua (para una revisión, ver Vogler, 1998).

El contenido de agua del gel dependerá entonces de la naturaleza de la superficie polimérica. Los geles construidos en derredor a una estructura de polímeros no cargados podrán tener una proporción de agua-a-polímero de hasta 3.000:1 (Osada y Gong, 1993). La estratificación de agua podría no ser la única fuerza impulsora para la retención de agua hidrofílica. Las fuerzas osmóticas podrían también atraer agua cuando iones contrarios se hallan presentes alrededor de las cargas superficiales –pero el hecho de que una proporción de agua-a-polímero de 10:1 es fácilmente lograda con polímeros no cargados implica que este factor podría ser de una relevancia secundaria.

En esencia, entonces, los geles de polímero y los geles celulares comparten rasgos distintivos estructurales básicos. Ambos están construidos a partir de matrices poliméricas que podrían contener una carga superficial sustancial; y ambas matrices se hallan investidas con apreciables cantidades de agua organizada, cuya extensión puede ser evaluada a través de diversos medios físico-químicos.

Las transiciones en la estructura del gel suponen cambios masivos en ambos polímero y solvente. El cambio del polímero, a menudo desde un estado extendido hacia otro contraído, es sumamente reconocido, mientras que el cambio acompañante del solvente es apreciado menos ampliamente. La Figura 8.3 muestra el destino del tiempo de relajación T_2 , el cual refleja la libertad de movimiento del agua. A medida que se incrementa la temperatura en una solución del polímero común cuyo acrónimo inglés es PNIPAM, el valor T_2 aumenta progresivamente, implicando un incremento progresivo de la libertad de movimiento. La muestra control de agua pura (abajo) muestra un comportamiento similar. Entonces, a la temperatura de gelificación crítica el valor T_2 decrece bruscamente: el agua repentinamente se torna restringida

mientras el sistema melifica. Un incremento progresivo de la movilidad sigue al incremento adicional de la temperatura. Pese a que el grado es difícil de cuantificar, la brusca inflexión indica un brusco cambio de la estructura del agua en cada lado de la transición.

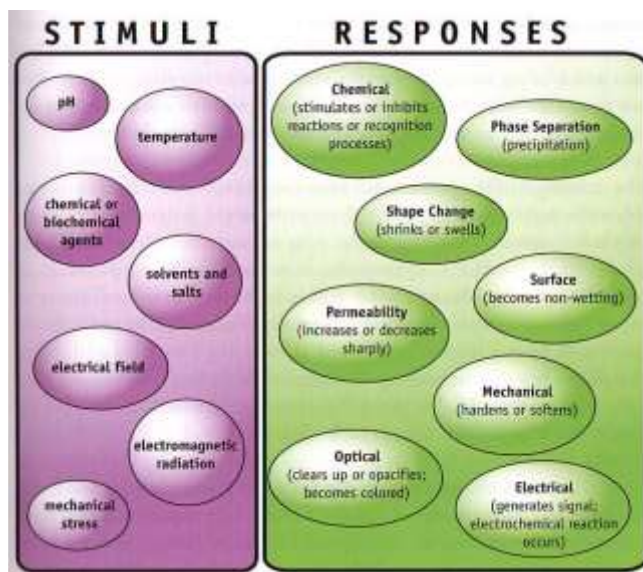


Tabla 8.1. Estímulos y respuestas típicos de los hidrogeles poliméricos. Según Hoffman (1991)

El cambio en la organización del solvente durante la transición también es insinuado por mediciones del ritmo al cual las sustancias pueden penetrar a través del gel. Tokita y Tanaka (1991) midieron la velocidad a la cual el agua presurizada podría ser forzada a través de un gel de poliacrilamida. Mientras el gel sufrió una transición (pero previamente a cualquier cambio en el volumen) la tasa de penetración aumentó por un factor de ~ 1.000 . La interpretación ofrecida fue un incremento de la no-uniformidad espacial: con algunos espacios matriciales abriéndose mientras otros estaban cerrados, una tasa de penetración desproporcionadamente más alta pudo lograrse a través de los espacios más amplios. Sin embargo, el cambio multiplicador por mil de la tasa de penetración parece al menos ser fácilmente explicado por un cambio en la estructura del agua similar a aquel que describe la Figura 8.3. La desestructuración bruscamente reduce la viscosidad y abre eficazmente los espacios de difusión del gel.

La alteración del estado del agua es clave para comprender cómo tiene lugar el cambio físico global. Consideren un gel cuyo polímero atraviesa una transición de larga a corta (Fig. 8.4). La configuración larga es estable por la sed de agua de las superficies hidrofílicas del polímero -el polímero se extiende para maximizar la cantidad de contactos de agua, minimizando por ende la energía del sistema. El estado corto también es estable. Aquí el polímero está plegado, con cargas de superficie contactando unas con otras en lugar de hacerlo con agua. El grado al cual las superficies cargadas dejan de estar expuestas, el agua vecinal será desestructurada. De esta manera, los dos estados difieren radicalmente, y un componente de la diferencia radica en el estado del agua.

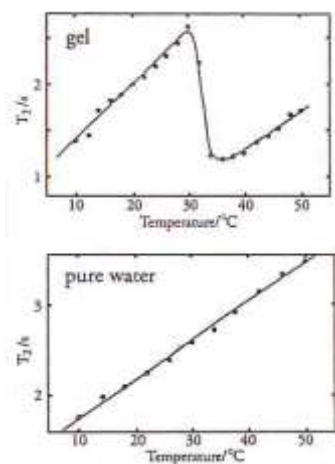


Figura 8.3. Efecto de la temperatura sobre el valor T_2 en el gel PNIPAM (según Yasunaga et al., 1996). Noten la abrupta reducción en el T_2 hacia el punto de gelificación.

COOPERATIVIDAD DE LA TRANSICIÓN

Ahora consideren la transición entre estos dos estados. Supongan un gel que está en equilibrio en el estado largo es expuesto a uno de los agentes disparadores listados en la Tabla 8.1. La exposición acerca al sistema apenas más allá de su punto crítico. Una vez que esto sucede, la transición procede hacia el estado acortado con la inevitabilidad de un estornudo (Fig. 8.1).

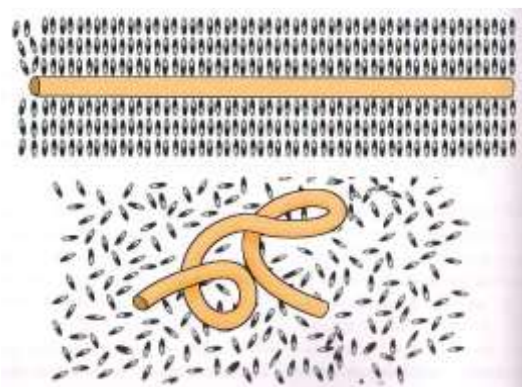


Figura 8.4. Configuraciones largas versus cortas. En el estado largo el polímero está rodeado por agua estructurada. En el estado corto el agua está orientada aleatoriamente.

¿Por qué así? ¿Por qué la progresión del cambio es tan inevitable como lo es?

La inevitabilidad presupone algún tipo de cooperativismo –un cambio que incrementa la propensión a un cambio adicional en la misma dirección. El cooperativismo típicamente surge a partir de la competición entre dos o más fuerzas, por ejemplo, dos imanes atrayendo una bola de hierro suspendida exactamente a mitad de camino entre ellos. Una leve perturbación lateral confiere una ventaja, lo cual asegura un completo balanceo hacia uno u otro imán. En el caso de la hebra de polímero, las fuerzas en competición surgen de la atracción del polímero para con agua y polímero. Cualquiera de ambos puede dominar. Consideren una hebra dominada por interacciones polímero-agua inicialmente, y acercada hacia una interacción polímero-polímero por un cambio medioambiental. Una vez que la cantidad de interacciones polímero-polímero excede un umbral crítico, la proclividad por más interacciones polímero-polímero deberá de algún modo aumentar si la transición habrá de proceder con inevitabilidad.

Un comportamiento cooperativo de este tipo puede lograrse de diferentes formas en diferentes geles, pero los mecanismos subyacentes casi seguramente involucran al agua como asimismo al polímero. La molécula de agua es poco común en cuanto puede formar enlaces de hidrógeno con hasta

otras cuatro moléculas de agua, creando una red vinculada mediante puentes de hidrógeno fuertemente interrelacionada. Se sabe que semejante enlazamiento es cooperativo –una vez que se forma un único enlace de hidrógeno, la proclividad hacia la formación de puentes de hidrógeno adicionales aumenta (Stillinger, 1980). Las perturbaciones de la estructura del agua pueden por eso propagarse (Watterson, 1977; Vogler, 1998), con una desestructuración del agua local esparciéndose hacia las regiones vecinas, más acortamiento polimérico, etc. (Fig. 8.5.).

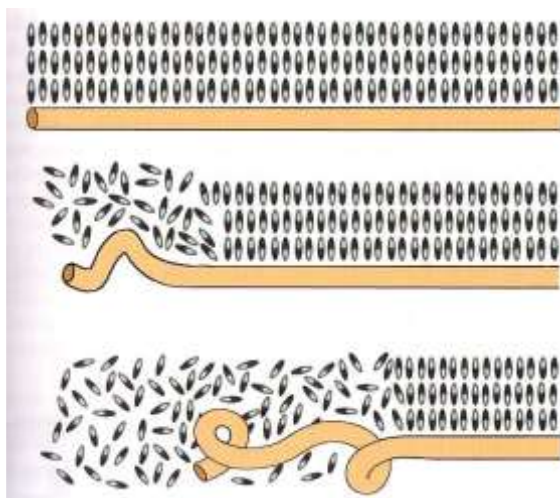


Figura 8.5. Propagación de la transición de fase mediante la despolarización del agua y la condensación polimérica.

El componente polimérico también contribuye con la propagación cooperativa, y esto puede constatarse de diversas formas. Un mecanismo se basa en la clásica teoría de la inducción establecida por G. N. Lewis a comienzos del siglo pasado y extendida en algún detalle por Gilbert Ling (1962, 1992). Conocida como la hipótesis de “Asociación-Inducción”, esta teoría propone que en una cadena de carbono tal como la de una proteína o un polímero, el cambio estructural local produce un desplazamiento de la nube de electrones, el cual induce un desplazamiento de nube similar y un cambio estructural en la siguiente región, etc. Por ende, la transición se propaga a lo largo del polímero. Este mecanismo de propagación es análogo a lo que ocurre cuando un magneto es acercado a un conjunto de clavos atados flojamente entre sí con trozos de cordel (Fig. 8.6.). El primer clavo es magnetizado lo cual magnetiza al segundo, etc., hasta que muchos o todos los clavos son reclutados hacia la nueva configuración. El cambio estructural se propaga de esta forma.

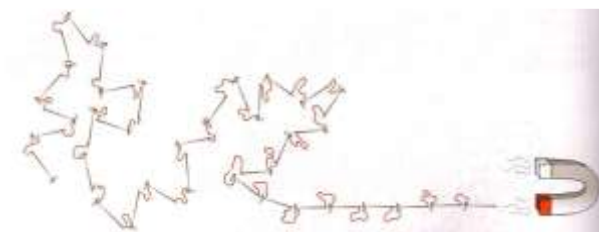


Figura 8.6. Analogía mostrando cómo los elementos pueden ser inducidos a organizarse cooperativamente.

Otro mecanismo de cooperativismo involucra a cationes divalentes tales como el calcio, los cuales son prevalentes en la célula. Debido a sus dos cargas positivas, los divalentes pueden asir los sitios aniónicos cercanos y mantenerlos fuertemente vinculados entre sí mediante enlaces cruzados. Imaginen una red de hebras poliméricas atravesando una fluctuación termalmente inducida, expuesta a niveles crecientes de calcio. Cuando dos superficies cualesquiera se acercan transitoriamente entre sí, el calcio puede vincular sus sitios aniónicos. Este vínculo obliga a las regiones flanqueantes de

las hebras a permanecer en una proximidad más cercana, incrementando la probabilidad de un enlazamiento cruzado adicional.

El proceso procede de un modo semejante al de un cierre de cremallera, con el polímero transicionando desde su estado hidratado, extendido, hacia un estado condensado en gran parte carente de agua (Fig. 8.7).

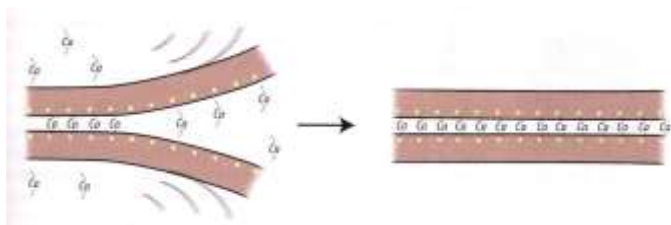


Figura 8.7. El calcio y otros cationes divalentes pueden puentear la brecha entre sitios negativamente cargados, resultando en una condensación tipo cierre de cremallera.

A través de mecanismos cooperativos tales como estos, un modesto cambio del ambiente puede inducir una acción masiva. El gel de polímero puede condensar y liberar la mayor parte de su agua. O, a la inversa, el polímero contraído puede sufrir una transición en orden inverso, embebiendo enormes volúmenes de agua y expandiéndose cooperativamente retornando hacia su estado expandido. Por supuesto que no siempre es tan simple. Algunos polímeros presentan estados intermedios de cuasi-estabilidad (Annaka y Tanaka, 1992), y la afinidad del polímero por el agua no necesariamente constituye un asunto de sí sí o si no. No obstante, los mecanismos de cooperativismo arriba descritos, involucrando a ambos polímero y agua, puede concebirse como genérica.

Pertrechados con estas imprescindibles nociones, consideramos varios ejemplos de transiciones de fase que fueron desarrolladas para un uso práctico. Tomamos en cuenta geles que producen en gran parte respuestas químicas, geles produciendo preponderantemente respuestas mecánicas y geles semejantes a proteína que producen respuestas quimiomecánicas. Al continuar, tendremos presente la pertinencia potencial de estas transiciones en el seno de la célula.

RESPONDEDORES QUÍMICOS

Un buen ejemplo de un respondedor químico es la así denominada válvula de gel, usada por la industria farmacéutica para la liberación de fármacos. En la aplicación corriente, la válvula rodea una capsula conteniendo la droga. Debido a la alta densidad del gel, las sustancias habitualmente no pasarán; pero cuando el gel sufre un cambio estructural que “abre sus poros”, las sustancias pueden pasar. La apertura está diseñada para ser inteligente. Por ejemplo, los medicamentos ingeridos pueden ser habitualmente atacados por el medioambiente ácido del estómago antes de poder alcanzar su sitio de destino en el intestino. Mediante el empleo de una válvula que sólo se abre en el ambiente más alcalino del intestino delgado, el fármaco es protegido de los estragos del ácido estomacal –un inteligente ardid que asegura una liberación eficaz. La estratagema funciona porque las transiciones son habitualmente sensibles al pH (Tabla 8.1).

La liberación de drogas también puede diseñarse para responder a la presencia de una sustancia química particular. Un buen ejemplo es la liberación de insulina en respuesta a la glucosa (Albin *et al.*, 1985). La insulina es encajonada dentro de la membrana de gel, la cual también contiene grupos

amino y glucosa oxidasa. La glucosa ambiental difundiendo dentro de la membrana es convertida a ácido glucónico por catálisis mediada por la glucosa oxidasa, de ese modo bajando el pH, incrementando la ionización y la repulsión de los grupos amino, y gatillando una masiva tumefacción y liberación de insulina. De esta forma la insulina es liberada sólo cuando la glucosa se halla presente.

Este sistema artificial mimetiza aquello que la naturaleza logra por sí misma a través de la célula beta pancreática.

Aún otro género de liberación de drogas inteligente está basado en la microesfera de gel. Aquí, una enzima o droga atrapada es liberada a medida que la microesfera atraviesa una transición y se hincha (Fig. 8.8). Un ejemplo específico es la célula mastocítica artificial –una matriz de proteoglicanos negativamente cargados cargada con histamina, la cual puede responder a un desafío inmunológico experimentando una transición de fase y una tumefacción (Yuan y Hoffman, 1995). Este proceso de liberación es bastante genérico – puede suministrar diversas sustancias bioactivas incluyendo lisozimas (Yuan y Hoffman, 1995) y drogas (Verdugo *et al.*, 1995).

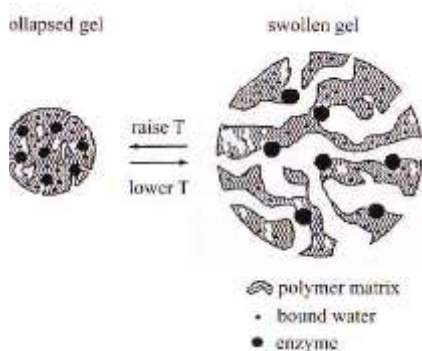


Figura 8.8. Liberación controlada de enzima o droga a partir de una microesfera de gel. Según Hoffman (1991).

Además de la liberación de sustancias, las transiciones de fase son útiles para la recuperación de sustancias (Cussler *et al.*, 1984). Un gel de poliacrilamida encogido es sumergido en un baño acuoso conteniendo los solutos a ser recuperados. En la transición sensible al pH, el gel embebe el agua del baño hasta 20 veces su peso. Debido a la exclusión de soluto basada en el tamaño (Capítulo 5), los solutos disueltos más grandes que un tamaño crítico no son en gran parte tomados: son dejados atrás en el baño para acumularse en más alta concentración para una más fácil recuperación. El proceso es útil, por ejemplo, para la recuperación de antibióticos a partir de un caldo de fermentación.

Los ejemplos más arriba ilustran desplazamientos de solutos hacia o apartándose de geles transicionando. El desplazamiento de soluto –o transporte- es un rasgo distintivo básico de la función celular. Si el transporte es alcanzable a través de una transición de fase es una cuestión que considerarán los diversos capítulos próximos.

RESPONDEDORES MECÁNICOS

Ahora avanzamos con los respondedores mecánicos (en realidad, quimio-mecánicos) –un ejemplo vívido de los cuales es el “rizador de geles” (Okuzaki y Osada, 1993). El rizador es una tira de gel que cuelga en solución de un listón de apoyo mediante dos lazos metálicos (Fig. 8.9). El gel se transporta a lo largo

en respuesta a un campo eléctrico alternante. Cuando el electrodo proximal es positivo, el borde del gel cerca del electrodo se encoge, rizando el gel y empujando su extremo de salida a lo largo de los dientes del trinquete. Cuando la polaridad es revertida el gel comienza a enderezarse y su parte delantera termina unas pulgadas adelante. De este modo el gel se impulsa a sí mismo como un gusano a lo largo del trinquete de apoyo.

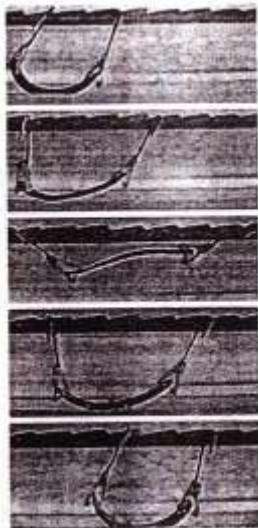


Figura 8.9. El “rizador de geles” se mueve de izquierda a derecha a lo largo de los dientes de sierra de un trinquete como resultado de transiciones de fase cíclicas en el gel. Según Osada y Ross-Murphy (1993).

Esta misma acción de doblez puede ser utilizada para jugar al “golf de gel”. Ver Figura 8.10. Aquí la acción de doblado del gel es usada para “pegarle” a una microesfera, la cual avanza a una pendiente donde se cae por un precipicio – como si fuese hacia el agujero.

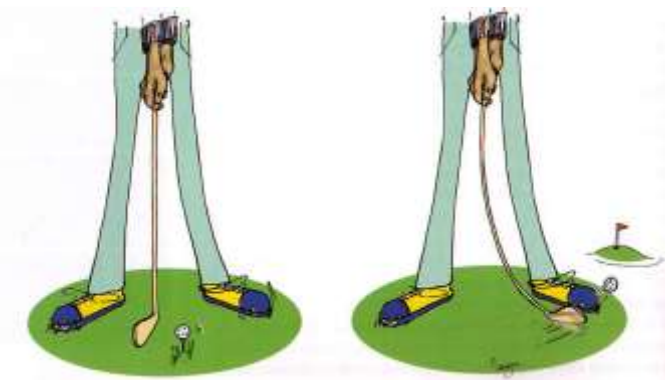


Figura 8.10. Golf de gel. El principio es el mismo que el ilustrado en la Figura 8.9, pero aquí el doblado del gel es utilizado para golpear una pequeña esfera. Según Osada y Ross-Murphy (1993).

Pese a que estas aplicaciones podrían parecer más extravagantes que útiles, ilustran cómo incluso cambios menores en la forma pueden ser aprovechadas para lograr desplazamientos sustanciales. Particularmente en el rizador de gel, movimientos tipo gusano repetidos pueden generar desplazamientos de magnitud apreciable. El mecanismo prevé movimientos serpiginosos, llamados reptantes, los cuales son, de hecho, característicos tanto de los polímeros artificiales como asimismo de los filamentos proteicos (Yanagida *et al.*, 1984; Kas *et al.*, 1994). La reptación podría conducir un filamento proteico a lo largo de una superficie o más allá de otro filamento (Capítulo 14).

Otro ejemplo de gel mecánicamente respondedor es el receptor de presión artificial (Sawahata *et al.*, 1995). Los geles co-polimerizados a partir del ácido poliacrílico y la poli(acrilamida) son particularmente sensibles a la fuerza mecánica. La presión induce un cambio en el pH y el potencial eléctrico (Fig.

8.11). El hecho de que este tipo de mecanismo pueda ser responsable de la recepción de presión en la célula es un interrogante planteado por los creadores del sensor.

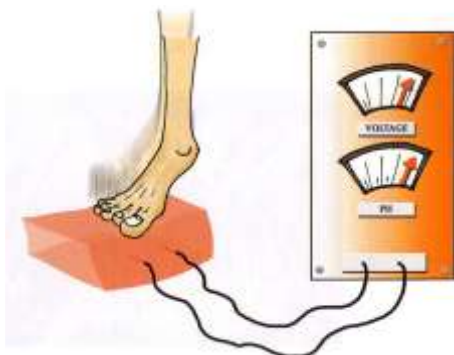


Figura 8.11. La presión mecánica puede generar un potencial eléctrico y un cambio en el pH. Según experimentos de Sawahata *et al.* (1995).

Finalmente, los geles pueden auto-oscilar. Cuando ciertos geles conductivos son situados en un campo eléctrico estable, oscilaciones de corriente sostenidas son detectables desde electrodos clavados en diferentes regiones del gel (Miyano y Osada, 1991). Las oscilaciones son rasgos comunes en sistemas bio-eléctricos tales como los marcapasos naturales. Pese a ser generalmente atribuidos a corrientes de membrana, tales oscilaciones pueden evidentemente surgir en geles carentes por completo de una membrana, implicando que éstas podrían asimismo surgir de los rasgos distintivos geliformes del citoplasma (Capítulo 10).

TRANSICIONES DE FASE EN GELES PROTEIFORMES

Existe un tipo de gel conformado por polímeros proteiformes que es diferente a los geles poliméricos arriba descritos. El más conocido entre ellos podría ser el gel elastomérico basado en un motivo repetitivo de elastina (Urry, 1993). Este gel sufre una transición reversible entre un estado más largo y uno más corto (Fig. 8.12). En el estado más largo el agua está ordenada; en el estado más corto el agua se halla desordenada, y el desordenamiento inducido puede facilitar la transición de largo-a-corto. La transición genera suficiente energía mecánica como para funcionar como un músculo artificial –el trabajo por unidad de volumen es similar al de una unidad de músculo de tamaño comparable. Y el gel puede ser ciclado a través de transiciones una y otra vez sin una degradación funcional perceptible.



Figura 8.12. Polímero semejante a elastina que sufre una transición entre estados largo (arriba) y corto (abajo). Según Urry (1993).

El desencadenamiento de esta transición elastomérica puede ser llevado a cabo por una multiplicidad de agentes. Uno muy común es la temperatura. La temperatura pone a las moléculas de agua en movimiento, desestabilizando su estructura y facilitando la transición de acortamiento. El viraje del pH es otro disparador, conjuntamente con la adición de sal, la exposición a solutos orgánicos, el incremento de presión y la exposición a la luz a continuación de la incorporación de cromóforo (ver Tabla 8.1). Un gatillo de impresionante

potencia es la fosforilación: por cada 300 moléculas de quinasa incluidas en el gel, un fosfato es todo lo que se necesita para disparar una transición masiva. Tal sensibilidad espeja aquello que sucede en la célula, donde la fosforilación de una pequeña cantidad de residuos escasamente distribuidos puede habitualmente disparar una acción masiva.

Un segundo ejemplo de gel proteiforme es el que está conformado en base a colágeno vinculado mediante enlazamiento cruzado. Cuando se lo sumerge en alta concentración de sal, este gel se acorta hasta alrededor de la mitad de su longitud –atravesando una transición desde una estructura helicoidal hacia un espiralado aleatorio cuya longitud de equilibrio es más corta que la de la hélice. Máquinas armadas en base a este principio fueron construidas por el renombrado químico físico Ahron Katchalsky y sus colegas. Las máquinas eran dispositivos ingeniosos en los cuales se lograban múltiples ciclos de acortamiento-alargamiento mediante la puesta de un cinturón de colágeno vinculado mediante enlace cruzado en contacto con soluciones de bajas y altas concentraciones de sal (Steinberg *et al.*, 1966). Al igual que con el gel de elastina, la producción de trabajo por gramo del gel de colágeno fue similar a la del músculo esquelético contráctil.

Las transiciones de fase también se observan en geles de “proteína artificial” construidos con polímeros estructurados en alfa-hélices, láminas beta y otros motivos proteicos comunes. Tales geles son cada vez más utilizados en aplicaciones para el suministro de medicamentos (Aggeli *et al.*, 1997; Petka *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999).

En suma, los geles semi-naturales aportan funciones útiles. Los geles de tipo elastina y colágeno experimentan una transición de fase, y al hacerlo generan trabajo mecánico que puede ser utilizable como un músculo artificial, o un dispositivo que acciona. En el gel de elastina, también se realizan funciones complementarias tales como la súper-absorción o el andamiaje de tejidos (Urry, 1993). Y, los geles basados en polímeros con motivos proteicos están siendo aplicados en sistemas de liberación de medicación. Semejantes éxitos con los geles semi-naturales constituyen un buen presagio respecto de la posibilidad de que los geles naturales en el seno de la célula puedan funcionar comparablemente.

CONCLUSIÓN

El potencial de la transición de fase no ha escapado a la atención de los científicos celulares. Los textos estándar toman en cuenta la naturaleza geliforme del citoplasma y frecuentemente prosiguen con la referencia a la transición “gel-sol” citoplasmática, la cual es un común integrante del conjunto de la transición de fase. En la ausencia de un marco teórico, sin embargo, los biólogos se han quedado con poco más que una vaga noción del fenómeno, con la cual es poco lo que puede hacerse.

El campo de los geles poliméricos, por el otro lado, expresa un creciente marco de comprensión. Impulsados en parte por el potencial para el diseño de dispositivos prácticos, los químicos e ingenieros han pasado mucho tiempo explotando la transición de fase, y afianzándose en la comprensión durante el proceso. Como resultado, una rica colección de productos recientemente ha llegado al mercado. Estos productos están basados principalmente en

transiciones a gran escala de volumen, forma, contenido de agua, potencial eléctrico, permeabilidad y/o contenido iónico (Tabla 8.1).

La relevancia de estas transiciones para la célula no es difícil de imaginar: la contracción surgiendo a partir del encogimiento; la motilidad surgiendo a partir del cambio de forma; el transporte surgiendo a partir de la separación de soluto; los potenciales de acción surgiendo a partir del cambio en la permeabilidad; etc. El concepto es, de hecho, menos radical de lo que ustedes podrían pensar. En los capítulos que siguen se tornará claro que la aplicación de las transiciones de fase ya se ha insinuado en una diversa cantidad de campos biológicos. Tales insinuaciones han esquivado el reconocimiento a gran escala, sin embargo, en gran parte porque han permanecido dispersas entre sub-disciplinas, y, por ende, carecen de cohesión.

Entre los rasgos distintivos atractivos de las transiciones de fase, uno de los más prominentes es la prodigiosa respuesta que puede ser evocada por un sutil cambio medioambiental tal como un leve cambio de la temperatura o el pH. Una amplificación semejante debería ser más realzada en el contexto biológico con el alto grado de orden habitualmente presente: Mientras que los geles sintéticos están típicamente contruidos por polímeros enredados con poco orden aparente, las organelas celulares tales como el axonema ciliar y el sarcómero muscular exhiben un orden supramolecular extraordinario, con patrones de difracción de rayos X mostrando una regularidad a un nivel más bajo de hasta ~ 1 nm. Con una regularidad estructural, el umbral de disparo debería ser el mismo en todos lados, y la respuesta debería entonces ser decisiva y rápida.

Otro rasgo atractivo de la hipótesis de la transición de fase es la noción implícita de que los procesos celulares no necesariamente son algo especial – las células operarían mediante los mismísimos principios físicos y químicos que gobiernan los sistemas no-biológicos comunes, y no a través de invenciones especiales del comité celestial. La noción de continuidad a través de la frontera entre lo viviente y lo no-viviente parece lógica porque la frontera es borrosa. ¿Está viva la semilla? ¿Y el virus? La presunción de principios similares operando a ambos lados de la frontera provee una transición apropiadamente libre de juntas entre lo viviente y lo no viviente. Ello también nos obliga acceder a la noción de que la célula no funciona mediante mecanismos especiales: Pese a que la célula pueda parecerse algo especial, sus mecanismos podrían ser totalmente rutinarios y completamente ortodoxos.

Un tercer rasgo atractivo es el potencial de que la función celular esté gobernada en gran parte por un único y común mecanismo subyacente. La vida sería en realidad bastante simple. Después de todo, el objetivo de la ciencia no es sumar capas de complejidad interpretativa aparente con cada descubrimiento, sino el de colapsar estratos de complejidad aparente en unos pocos principios rectores simples: la parsimonia debería prevalecer. Si la adecuación de la transición de fase es confirmada, existe un alto potencial para la simplicidad.

Por el otro lado, uno necesita ser consciente del encanto seductor de la simplicidad. Será cuestión de verificar si la transición de fase es meramente una noción extravagantemente atractiva o si realmente puede explicar fenómenos conocidos de un modo más naturalmente directo de lo que lo hacen los mecanismos actuales. En los capítulos que siguen hacemos precisamente

eso –consideramos si la transición de fase provee explicaciones directas para los procesos celulares básicos tales como la secreción, la comunicación, el transporte, la motilidad, la división y la contracción.

SECCIÓN IV

APROXIMACIÓN A LA DINÁMICA CELULAR

Esta sección busca detalles de una activa función celular. Basada en los capítulos previos, explora la posibilidad de un fundamento subyacente común para la acción celular –la transición de fase.



Lacrimoso, 2000, por David Olsen

CAPÍTULO 9: SECRECIÓN

Tratamos primero con el principal vehículo de la célula para la comunicación externa –la secreción. La secreción supone la descarga celular de sustancias químicas, lo cual puede incluir enzimas, hormonas, neurotransmisores o agentes especiales dependiendo del tipo celular. Las sustancias a ser secretadas son empacadas en pequeñas vesículas y embarcadas hacia los sitios cerca de la periferia celular. Allí quedan preparadas para la liberación, a la espera de un estímulo químico o eléctrico.

Un buen ejemplo es la célula nerviosa. Cuando es activada por un potencial de acción, la región terminal de la célula secreta un neurotransmisor que difunde a través de una corta brecha hacia una célula muscular u otra neurona, donde este dispara un potencial de acción. De este modo la cadena de información es pasada de célula a célula. Otro ejemplo es el mastocito. El mastocito contiene bolsas de histamina, las cuales son descargadas cuando los antígenos se adosan a un receptor en la superficie celular. La histamina descargada difunde localmente y hacia la circulación sistémica, donde puede defenderse contra los patógenos invasores.

Consideramos primero a la secreción debido a su simplicidad esencial. Pese a que la sucesión de eventos pueda ser intrincada, el foco aquí es puesto sobre la descarga –la liberación de bolsas químicas desde la célula. La cuestión es si la acción simple podría involucrar algún tipo de transición de fase.

ESTRATEGIAS

De acuerdo con las visiones actuales, la vesícula secretoria es una especie de sopa rodeada por una membrana –una miniatura de la célula misma según la visión clásica. La sopa contiene la sustancia a ser secretada incrustada en una matriz de polímeros. Para la descarga, la vesícula se acopla a la membrana celular. Las membranas de la célula y la vesícula se fusionan, abriendo el interior de la vesícula hacia el espacio extracelular y permitiendo que el contenido de la vesícula escape mediante difusión (Fig. 9.1).

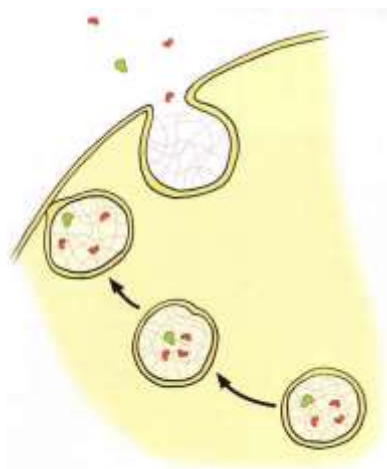


Figura 9.1. Visión clásica del proceso de liberación secretoria.

Pese a ser atractivo en virtud de su aparente simplicidad, este mecanismo no es fácilmente reconciliable con varias líneas de evidencia. Una preocupación es que la descarga es a menudo acompañada por una dramática expansión de la vesícula. Alguna expansión es esperada porque los solutos concentrados en la sopa pueden atraer agua osmóticamente: si el agua difunde hacia adentro

antes de que los solutos difundan hacia fuera, la vesícula podría expandirse transitoriamente. La expansión observada, sin embargo, puede ser prácticamente explosiva. Vesículas productoras de mucina aisladas sufren una expansión de 600 veces su volumen dentro de los 40 milisegundos (Verdugo *et al.*, 1992). Vesículas de Nematocistos, células punzantes acuáticas, son capaces de tasas de expansión linear de $2.000 \mu\text{m}/\text{ms}$ (Holstein y Tardent, 1984). Tan fenomenales expansiones implican algo que trasciende la mera difusión pasiva de agua.

Un segundo asunto es que la expansión responde anómalamente a los solventes (Fig. 9.2). Los contenidos de la vesícula pueden ser expandidos y recondensados muchas veces por la exposición a diversas soluciones. Pero las soluciones requeridas no son las esperadas. Cuando las matrices vesiculares condensadas son expuestas a soluciones de baja osmolaridad –incluso el agua destilada– permanecen condensadas a pesar de que su sed de agua debería ser enorme (Fernandez *et al.*, 1991; Verdugo *et al.*, 1992). Pero si pequeñas cantidades de sodio ($< 10 \text{ mM}$) son vertidos en estas soluciones de baja osmolaridad, las matrices se expanden instantáneamente.

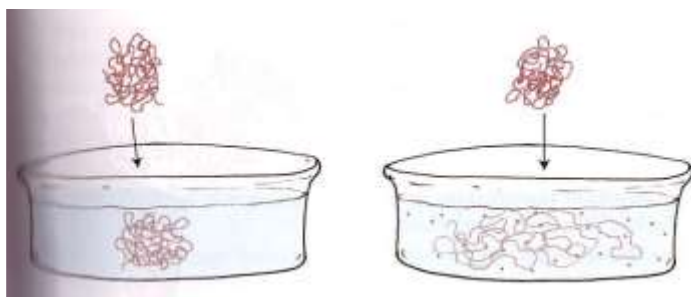


Figura 9.2. Las matrices vesiculares condensadas sumergidas en soluciones de baja osmolaridad no adsorben agua (izquierda). Sin embargo, cuando se agregan a las soluciones pequeñas cantidades de sodio (derecha), las matrices se expanden completamente.

Una anomalía similar se aplica a la recondensación de la matriz expandida. La adición de suficientes solutos al baño debería retirar el agua y precipitar la condensación. Pero las matrices expandidas no muestran casi ninguna respuesta incluso cuando a la solución del baño se le agrega 1 M de sucrosa; sólo se observa un encogimiento de $\sim 2\%$ (Curran y Brodwick, 1991). Los mecanismos osmóticos nuevamente dejan de ser suficientes –los contenidos de la vesícula no se comportan como la sopa de pollo.

Dadas tales anomalías, no es ninguna sorpresa que los investigadores hayan comenzado a mirar para otros lados en busca de mecanismos. Varios grupos incluyendo a los de Pedro Verdugo de la Universidad de Washington y Julio Fernandez en la Fundación Mayo han buscado explicaciones cada vez más dentro del ámbito de la transición de fase

¿Por qué la transición de fase? Un motivo es que la vesícula está construida de una densa red polimérica que se expande abruptamente. Un segundo motivo es que la expansión y la descarga requieren un cambio crítico en el medioambiente: cuando la temperatura o la composición de la solución orillan más allá de un umbral, las matrices se expanden o condensan abruptamente. En los casos de las matrices de mastocitos y células caliciales secretoras de moco, los umbrales para la expansión se hallan dentro de una ventana tan estrecha como el 1% del valor crítico (Verdugo *et al.*, 1992). Por lo tanto, los criterios de rúbrica de la transición de fase están satisfechos.

Así también lo están otros rasgos distintivos anticipados de las transiciones de fase (Tabla 8.1). Estos incluyen: cambio sustancial en el volumen, cambios de

solvente, cambios de consistencia, e incluso el disparo mediante una corriente eléctrica (Nanavati y Fernandez, 1993).

El mecanismo de transición de fase también parece ser estratégicamente sensible. Las células secretoras se especializan en altas cargas explosivas. En la terminal del nervio, por ejemplo, la concentración de acetilcolina alcanza los 2 M –lo suficiente como para impulsar intensas ráfagas de descarga de neurotransmisor. Las concentraciones de tal magnitud habitualmente conferirían un empuje osmótico intenso que alcanza para inundar la célula con agua. Pero este escenario empapado es evitado mediante la utilización de la transición de fase para envasar moléculas en agregados condensados y así Disminuir la atracción osmótica. La matriz condensada puede re-expandirse más tarde mediante una transición reversa que permite a las fuerzas de hidratación estallar la matriz y expeler las moléculas de neurotransmisor.

Una analogía conveniente es la del muñeco en una caja de resorte, la “caja sorpresa” (Fig. 9.3). Del mismo modo en que un muñeco pegado al extremo de un resorte puede ser embutido dentro de una pequeña caja, el polímero puede ser comprimido dentro de una pequeña vesícula. La energía almacenada es luego liberada cuando el muñeco salta fuera de la caja, o cuando la vesícula explota. La energía almacenada es disipada en gran parte como entropía aumentada o desorden (Capítulo 15) –algo parecido a cuando revienta el maíz al hacer pochoclo.



Figura 9.3. La analogía del muñeco en la caja para la liberación secretoria. Según Verdugo *et al.* (1992).

Como un principio explicativo, entonces, el mecanismo de transición de fase posee algo de potencial. Puede explicar la expansión vesicular, y puede explicar por qué las consideraciones osmóticas no alcanzan para aclarar la respuesta a los solventes. Si acaso este mecanismo resulta adecuado sólo puede ser determinado a través de encarar temas básicos tales como: ¿qué es lo que mantiene condensada a la matriz? ¿Cómo es disparada la expansión? Y ¿cómo, exactamente, podría la expansión estar vinculada a la descarga química?

CONDENSACIÓN

Al explorar la condensación, resulta tentador nominar como protagonista a la membrana vesicular. La membrana podría mantener empaquetado el contenido vesicular así como la caja mantiene al muñeco apretado adentro. Pero hay un problema. Las matrices secretoras pueden condensar incluso en ausencia de una membrana: mediante la exposición a soluciones apropiadas (ver más arriba), las matrices vesiculares pueden ser expandidas y re-condensadas muchas veces. No se requiere membrana alguna. Tampoco queda claro cómo una membrana podría forzar la condensación del contenido encerrado.

Un mecanismo de condensación más plausible deriva a partir de la naturaleza físico-química de la matriz. La matriz está conformada por polímeros cargados. Muy comúnmente, los polímeros se hallan aleatoriamente enmarañados, pero también pueden estar semi-ordenados, como en las vesículas de células caliciales, o incluso cristalinos, como en las vesículas de las células beta pancreáticas conteniendo insulina. Aunque la arquitectura matricial varía, lo que permanece invariable es el carácter fuertemente aniónico de los polímeros. Una alta carga negativa es la norma.

La matriz condensa porque sus sitios negativamente cargados pueden estar unidos entre sí mediante enlazamiento cruzado (ver Fig. 8.7). Los cationes divalentes son eficientes conectores mediante enlace cruzado en virtud de su alta densidad de carga (Katchalsky y Zwick, 1955): tal como dos manos agarrándose, las dos cargas positivas pueden unir en cercana proximidad dos sitios de la superficie polimérica negativamente cargados. Tal como uno podría anticiparlo de semejante mecanismo, la efectividad del enlazamiento cruzado sigue estrictamente a la valencia: los monovalentes son inefectivos, los divalentes son efectivos y los trivalentes son especialmente efectivos (Curran y Brodwick, 1991). Un ejemplo de esta jerarquía es el comportamiento de la histamina. A un pH neutral, la histamina se comporta como un catión monovalente, mientras que a un bajo pH (3 – 4), se torna divalente. La histamina divalente condensa fácilmente a la red polimérica, mientras que la histamina monovalente no lo hace (Fernandez *et al.*, 1991).

A medida que los enlaces cruzados condensan la red de polímero, el agua adsorbida debe ser forzada hacia fuera (Fig. 9.4). La matriz entonces se torna seca, granular, condensada –y relativamente fácil de transportar (Capítulo 11). Permanece estable porque los divalentes son retenidos firmemente: intercambian lentamente en el seno de la matriz y muy poco con el espacio afuera de la matriz (Rabenstein *et al.*, 1987).

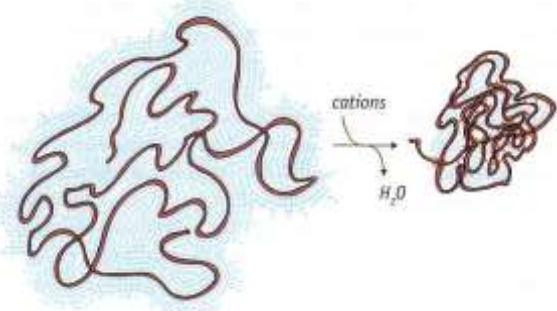


Figura 9.4. Mecanismo de condensación. Cuando los cationes divalentes enlazan cruzadamente la matriz negativamente cargada, el agua adsorbida es forzada hacia fuera.

Un ejemplo de una red tan condensada se da en la vesícula de la célula mastocítica. El polímero aniónico es la heparina, un glucosaminoglicano gigante adosado a un núcleo proteico. Dependiendo del pH, la heparina contiene dos a tres cargas negativas por cada unidad de repetición de disacárido, otorgándole al polímero una carga negativa extremadamente alta. El conector mediante enlace cruzado es la histamina –un catión divalente. La histamina lleva los sitios aniónicos de la heparina hacia la coalescencia y condensa la red. Mantiene a la red en su estado condensado hasta que algún agente gatilla la expansión.

EXPANSIÓN

Para disparar la transición expansiva, los cationes divalentes necesitan estar librados. Una vez que unos pocos puentes catiónicos se rompen, las fuerzas repulsivas que surgen desde la carga negativa de las superficies empujarán las hebras separándolas, permitiéndoles satisfacer su natural sed de agua. Los dipolos de agua se estructurarán uno encima de otro, presionando a los polímeros hacia una mayor separación (Fig. 9.5). A medida que los puentes flanqueantes son rotos por esta fuerza acuñadora, se adsorberán aún más dipolos de agua, y así sucesivamente. A través de este proceso similar a “abrir un cierre” la vesícula se expande y solubiliza rápidamente, permitiendo la liberación de su contenido químico hacia el medioambiente.

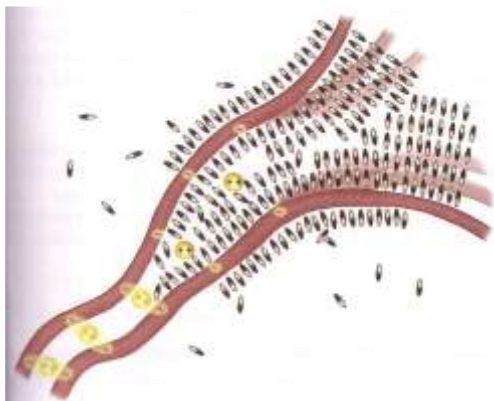


Figura 9.5. Mecanismo de expansión. Mientras la rotura de los puentes divalentes permite a las hebras separarse, el agua se aferra crecientemente a las superficies aniónicas. Esto empuja las superficies hacia una mayor separación, por ello rompiendo más puentes, y expandiendo más aún a la matriz.

Mecanismos expansivos de este tipo no carecen de precedentes. Al sumergir en agua polímeros sintéticos altamente cargados, secos, su volumen se expande habitualmente unas 3.000 o más veces a través de la adsorción (Osada y Gong, 1993). Esta cifra es cuantitativamente similar a la expansión de una matriz vesicular que es, digamos, inicialmente mitad agua y sufre un incremento de 500 veces su volumen –el contenido de agua habrá aumentado en 1.000 veces.

La expansión es impresionante porque el potencial de adsorción de la superficie hidrofílica del polímero es tan importante. El agua es atraída adentro capa sobre capa. El proceso de atracción en última instancia se termina cuando el potencial atractor de agua de la superficie se agota o cuando la matriz polimérica es forzada hasta su límite físico. Estos factores normalmente no son severamente restrictivos, sin embargo, de modo que la hidratación es típicamente prodigiosa. Las moléculas de agua en el seno de la matriz permanecen organizadas: Las más cercanas a la superficie están más altamente estructuradas, mientras que las capas más distantes se hallan progresivamente menos estructuradas. Si las hebras poliméricas no están permanentemente unidas mediante enlaces cruzados y la estructura de las capas más externas es débil, la matriz descargada puede disiparse.

¿Qué les pasa a los cationes desplazados? Si la matriz se disipa, los cationes divalentes pueden simplemente alejarse por difusión. Si la matriz descargada no se disuelve, los cationes serán forzosamente expelidos en virtud de su baja solubilidad en agua estructurada –la solubilidad es restringida debido al gran radio hidratado del catión (Capítulo 6). Como el agua se organiza alrededor de los polímeros, los cationes entonces serán eyectados.

En ello radica el remate del chiste. Con rara excepción, los cationes divalentes responsables de mantener condensada a la matriz –calcio, histamina, adrenalina, mucina, serotonina, etc.- son los agentes que serán secretados.

Librados del enlazamiento cruzado, estos cationes son puestos en libertad para transportarse hacia sus respectivos destinos. Los conectores mediante enlace cruzado se tornan agentes de comunicación.

GATILLADO

El disparo de la descarga toma lugar a continuación de un ciclo de eventos organizados que incluyen el transporte de la vesícula hasta la periferia celular (Valentin *et al.*, 1999).

Tal organización trasciende el alcance de este capítulo, aunque podría involucrar mecanismos de transporte citoesquelético como aquellos contemplados en los próximos varios capítulos. Aquí la cuestión es el disparador primordial -¿por qué explota la vesícula cuando es expuesta al espacio extracelular?

Un lógico candidato sería algún rasgo distintivo del nuevo ambiente. En el espacio extracelular están presentes en abundancia los cationes monovalentes tales como el sodio. Los monovalentes concentrados pueden desplazar a los divalentes (Capítulo 6). Cuando lo hacen, los geles se expanden abruptamente en la forma inversa a como los geles expandidos se condensan cuando son expuestos a divalentes (Katchalsky y Zwick, 1955; Tanaka, 1981). Este paradigma tipo “calesita” es ejemplificado en la Figura 9.6. El gel o se expande o se contrae a través de una estrecha ventana dependiendo de la relación monovalente/divalente. Este paradigma parece ser un rasgo distintivo general de los geles polianiónicos incluyendo a aquellos involucrados en la secreción (Uvnas y Aborg, 1977; Verdugo *et al.*, 1992). Por ende, la sustitución de iones monovalentes es un candidato plausible para el disparo de la expulsión de divalentes.

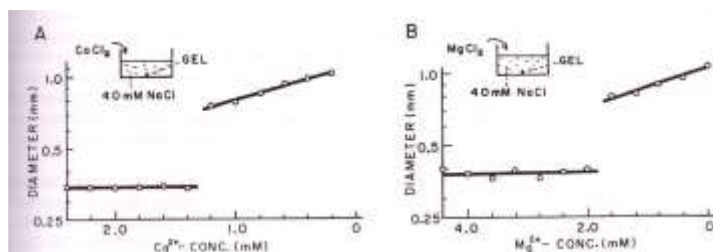


Figura 9.6. El paradigma del intercambio monovalente-divalente. La adición de calcio o magnesio divalentes a soluciones conteniendo sodio ocasiona un abrupto encogimiento de los geles poli (acrilato de sodio). La remoción de los divalentes dispara la expansión. De Tasaki y Byrne (1992)

Entre los monovalentes, el sodio es por lejos mucho más abundante en el espacio extracelular que el potasio, y es por tanto el candidato probable. La alta concentración de potasio adentro de la célula, sin embargo, plantea la cuestión de la liberación prematura. Una catástrofe semejante es evitada porque la vesícula intracelular está envuelta por una membrana lipídica –e incluso si esta barrera de lípido estuviera ausente o incompleta, el potasio se halla en gran parte ligado a proteínas y por ende inaccesible (Capítulo 3). Por ende, la liberación está reservada para el espacio extracelular, donde el sodio abundante puede desplazar al calcio y disparar la expansión.

El mecanismo arriba descrito en última instancia se basa en diferencias de afinidad entre monovalentes y divalentes. El sodio puede desplazar a los divalentes debido a que su afinidad por las cargas superficiales negativas es mayor. Los divalentes poseen una afinidad más baja (excepto cuando el puentado aniónico se halla involucrado). Esto ocurre porque su carga concentrada construye cubiertas de hidratación más grandes, lo cual requiere

más energía para ser quitada (Capítulo 6). En concordancia con la serie de Hofmeister, se prevé que las afinidades serán: $K^+ > Na^+ > Ca^{2+}$ y otros divalentes $>$ cationes trivalentes. En realidad, el Na^+ y el K^+ desplazan al Ca^{2+} para la expansión de la matriz (Uvnas *et al.*, 1985); y para la condensación, el lantano trivalente es incluso más efectivo que el Ca^{++} y el Mg^{++} (Curran y Brodwick, 1991). El mecanismo es por tanto bastante ortodoxo.

CONCLUSIÓN

El mecanismo secretorio propuesto se basa en la naturaleza físico-química de la matriz vesicular (Fig. 9.7). Todas las vesículas estudiadas hasta la fecha contienen polímeros negativamente cargados enlazados cruzadamente por un catión multivalente. Dado que las vesículas se forman en presencia del catión (calcio, histamina, adrenalina, mucina, etc.), la respectiva matriz es condensada en un firme paquete. El paquete es luego embarcado hacia la periferia celular en anticipación a un potencial de acción o alguna otra señal para la liberación. Cuando el contenido vesicular se abre al espacio extracelular, el sodio desplaza al divalente. El sodio no puede vincularse mediante enlace cruzado, por lo que la red gana libertad para expandirse. La rápida expansión es facilitada mediante la asociación de agua, cuya estructura estratificada excluye a los divalentes, los cuales son por ello expelidos y liberados para actuar.

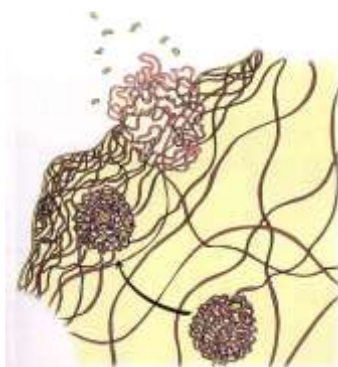


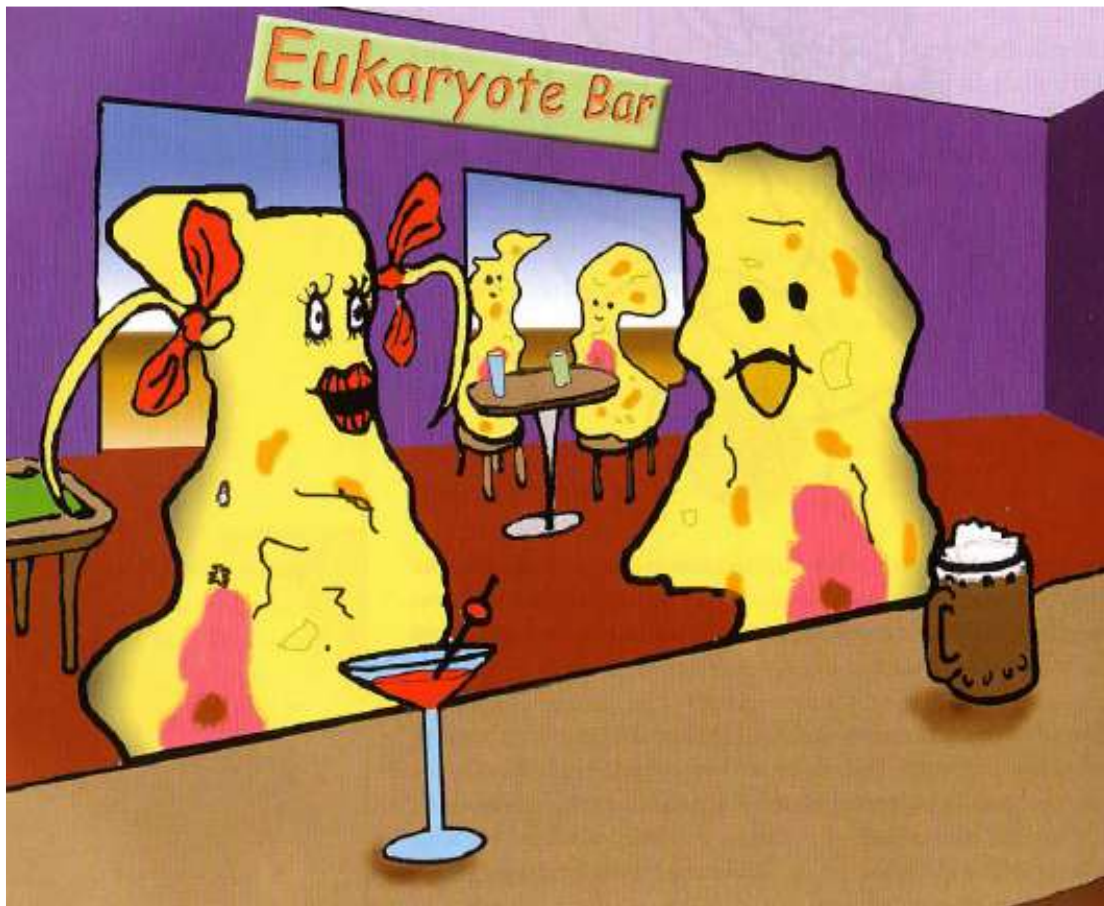
Figura 9.7. La liberación de cationes divalentes hacia el espacio extracelular mediante el mecanismo de transición de fase.

Mientras que todos estos pasos parecen consistentes con la evidencia disponible, dos rasgos del mecanismo parecen ser especialmente impresionantes. Primero, el agente utilizado para condensar la red es el mismo agente responsable de la acción. La única excepción conocida para esta norma es el sistema de liberación de insulina, donde el agente activo es la matriz misma y el catión es el Zn^{++} . El aprovechamiento del mismo elemento para la condensación y la acción constituye un pulcro truco de la naturaleza. Y también lo es el condensar estos agentes catiónicos en paquetes de modo tal de evitar los estragos de la inundación osmótica.

El mecanismo de transición de fase de la secreción permanece en gran parte desconocido para los biólogos, pero los ingenieros y los químicos han empezado a aprovecharlo para la liberación de drogas artificial (Capítulo 8; ver también Kiser *et al.*, 1998). Por lo tanto, el principio trasciende lo teórico – funciona. La cuestión a mano es si este es el principio de funcionamiento en la célula, y las observaciones precedentes le brindan sustancia a semejante posibilidad.

El próximo capítulo explora otro proceso de expansión de una matriz –el potencial de acción. Aquí nuevamente un mecanismo de libro de texto ha

usurpado el lugar durante muchos años, y aquí otra vez varios grupos han perseguido un modelo alternativo basado en la transición de fase.



"Hey, nena, ¿cuál es tu phylum?"

CAPÍTULO 10: EL POTENCIAL DE ACCIÓN

Extraña pero idóneamente denominado, el potencial de acción es la transitoria espiga eléctrica que galvaniza la célula hacia la acción. Desencadena procesos que abarcan desde la secreción hasta la contracción.

Las explicaciones sobre el potencial de acción dada por los libros de texto provienen de los bien conocidos experimentos de Hodgkin y Huxley a comienzos de la década de 1950. Hodgkin y Huxley estudiaron las propiedades eléctricas del axón del calamar gigante. Mediante la introducción de un largo electrodo dentro del centro del axón y el posicionamiento de un electrodo complementario afuera, ellos pudieron imponer pasos de voltaje a través de la membrana y medir las corrientes resultantes. Sus observaciones fueron seminales. Condujeron a un modelo en el cual el potencial de acción se suscitaba a partir de discretas corrientes de membrana-canal (Fig. 10.1).

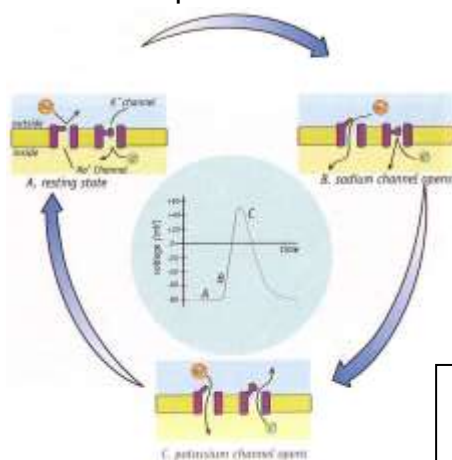


Figura 10.1. Modelo clásico explicando los eventos que conducen a un potencial de acción.

En este modelo, los canales de sodio se abren primero, disparados por una señal química o eléctrica. El sodio fluye en descenso a lo largo de su gradiente de concentración, trayendo carga positiva adentro de la célula y permitiendo que se abran los canales de sodio. El potasio luego fluye hacia fuera de la célula. Esto devuelve al potencial hacia su nivel de reposo negativo, momento en el cual sodio y potasio son bombeados a través de la membrana para restaurar la condición inicial. El potencial de acción se propaga debido a que los eventos eléctricos locales inducen la apertura de los canales lindantes, creando una ola que se desplaza rápidamente a lo largo de la membrana. Estos procesos son ulteriormente detallados en los libros sobre biología celular estándar tales como el de Alberts *et al.*, (1994).

En este mecanismo se presuponen roles centrales para los canales de sodio y potasio. Sin embargo, cuando el sodio es extraído del medio circundante al axón, los potenciales de acción no son obliterados; potenciales de acción “libres de sodio” se hallan documentados en un amplio array de preparaciones experimentales (Meaves y Vogel, 1973; Inoue *et al.*, 1973; Tasaki, 1982, 1988). Células nerviosas de sapo y fibras musculares de crustáceos, por ejemplo, producen robustos potenciales de acción en medios sin contenido alguno de sodio (Osterhout y Hill, 1933; Hagiwara *et al.*, 1964). Dependiendo de las condiciones iónicas, tales potenciales de acción pueden ser de amplitud normal, aunque su duración es generalmente extensa. Por ende, la espiga de marcha positiva puede ser producida cuando el sodio se halla ausente.

Similarmente, no hay requerimiento específico alguno para el potasio. Cuando el potasio interno es reemplazado por sodio, la excitabilidad persiste durante

horas siempre y cuando el calcio esté presente en una concentración suficientemente alta (Tasaki, 1982). Los potenciales de acción son nuevamente de más larga duración y de la mitad de la amplitud normal. Pero la reversión de voltaje característica evidentemente no requiere potasio, al igual que la carrera ascendente no requiere sodio. Los roles de estos iones no son únicos.

Argüir entonces que el potencial de acción proviene únicamente de características específicas de canales de sodio y canales de potasio resulta infundado. El mecanismo subyacente debe involucrar algún elemento menos riguroso. Por el otro lado, el sodio y el potasio (o sus substitutos) en efecto fluyen hacia adentro y afuera de la célula durante el potencial de acción y el desafío es comprender cómo. Si tales flujos no dependen de canales específicos, ¿cuál puede ser el agente responsable?

EL CITOESQUELETO PERIFÉRICO

Situado justo por dentro de la membrana celular se halla una densa matriz de gel polimérico conocida como el citoesqueleto periférico (Figura 10.2). La presencia de semejante matriz había sido desconocida durante la era de Hodgkin-Huxley cuando los axones experimentales eran rutinariamente “enrollados” a fin de provocar la extrusión del citoplasma y presumiblemente dejar solamente la membrana. Lo que en realidad queda es la combinación de la membrana más el citoesqueleto contiguo (Metuzals y Tasaki, 1978) —este último 100 veces más grueso que la precedente. Corrientes “transmembrana” fluyen a través de ambos. Las corrientes clásicamente medidas podrían surgir tanto a partir de la dinámica del citoesqueleto como asimismo de la dinámica de la membrana.

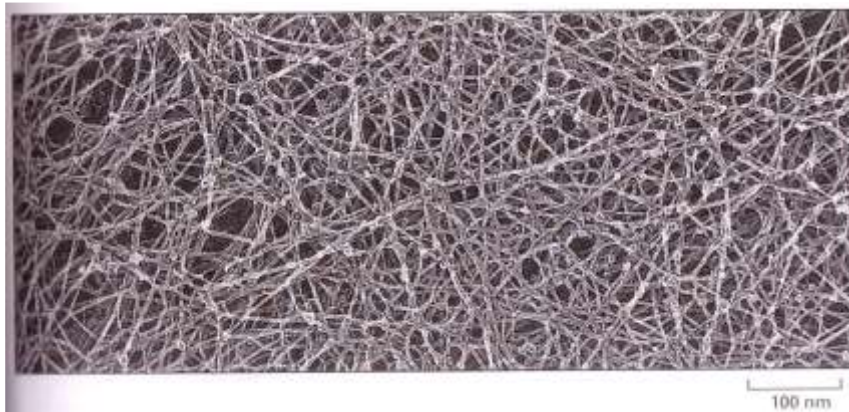


Figura 10.2. Imagen por congelamiento-fractura del citoesqueleto periférico obtenida por John Heuser.- (de Alberts *et al.*, 1994)

El citoesqueleto periférico está compuesto principalmente por filamentos de actina y microtúbulos unidos por enlace cruzado. En la célula nerviosa, los filamentos de actina se agrupan en focos definidos, mientras que microtúbulos enredados corren axialmente justo por debajo de la membrana. Ambos se hallan presentes en alta densidad, y ambos están dotados con una alta carga de superficie negativa (Tsukita *et al.*, 1986). Por ende, el citoesqueleto puede ser concebido como una cubierta de carga negativa que envuelve a la célula. Islas de carga adicionales se esparcen por el citoplasma (capítulo 7) pero el armazón periférico es continuo. Un micro electrodo clavado dentro de la célula deberá, por tanto, registrar un potencial decididamente negativo (Fig. 10.3).

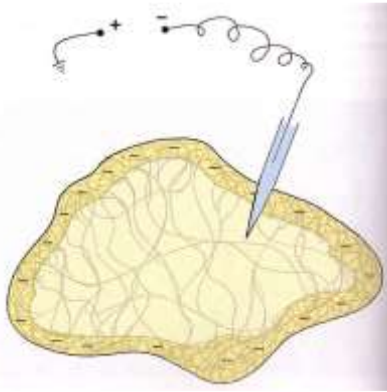


Figura 10.3. El citoesqueleto periférico rodea al citoplasma con un anillo de carga negativa, conduciendo a un potencial celular negativo.

Si el potencial celular surge en gran parte a partir del citoesqueleto, entonces cualquier cambio de potencial celular implica un cambio respectivo en el citoesqueleto. Esto último es plausible –filamentos de actina y microtúbulos atraviesan ambas transiciones físicas descritas en detalle en los próximos dos capítulos. Si tales transiciones expanden la matriz citoesquelética del mismo modo en que las transiciones expanden la matriz secretoria (Capítulo 9), el contenido de agua aumentado podría permitir el pasaje de los iones. El sodio podría fluir hacia adentro, bajando a través de su gradiente de concentración, y el potasio podría fluir hacia fuera. La prospectiva de una transición de fase del gel citoesquelético, por tanto, parecería digna de ser explorada.

La hipótesis de la transición de fase para la generación del potencial de acción ha sido perseguida extensivamente en los laboratorios de dos científicos: Ichiji Tasaki en el NIH (Instituto Nacional de Salud, EE. UU.), y Gen Matsumoto en Japón. Formado en el laboratorio de Sir Alan Hodgkin a comienzos de la década de 1950, Tasaki obtuvo reconocimiento mundial en electrofisiología clásica y luego rompió filas. Sus visiones, basadas principalmente en los resultados de experimentos directos, simples, han implicado a la transición de fase del gel citoesquelético como el exclusivo mediador del potencial de acción. El trabajo de Matsumoto detalla los cambios citoesqueléticos específicos que acompañan al potencial de acción, y muestra que la eliminación del citoesqueleto periférico elimina el potencial de acción. Para un detalle mayor del que resulta práctico presentar aquí, recomiendo una revisión de Matsumoto (1984), como asimismo un libro y una revisión más reciente realizados por Tasaki. Con 90 años de edad, Tasaki continúa dándole caza a este fenómeno diariamente.

¿INTRICACIÓN DEL CITOESQUELETO?

La vinculación entre el potencial de acción y el citoesqueleto periférico es denotada en maniobras que dañan el citoesqueleto periférico. En el citoesqueleto del axón del calamar, los microtúbulos se hallan amontonados en una densidad cuadrículada de $\sim 100/\mu\text{m}^2$ justo por dentro de la membrana, y van raleando sustancialmente con la distancia hacia el interior (Endo *et al.*, 1989). Este gradiente de densidad es obliterado por la droga colchicina, la cual disuelve principalmente los microtúbulos periféricos (Matsumoto *et al.*, 1982; 1983). En concentraciones que sólo eliminan el gradiente espacial, hay una pérdida concomitante de excitabilidad eléctrica. Un encadenamiento similar es constatado con otra media docena de agentes despolimerizadores de microtúbulos (Matsumoto *et al.*, 1984). La despolimerización de microtúbulos también impacta sobre la excitabilidad cardíaca (Gomez *et al.*, 2000).

Existe la posibilidad, sin embargo, que tales efectos paralelos sean meramente coincidentes. Para confirmar esta posibilidad, microtúbulos desgajados fueron repolimerizados. El centro del axón del calamar cuya excitabilidad había sido dañada mediante la exposición a colchicina fue perfundido con una solución conteniendo microtúbulos y proteínas de enlazamiento cruzado de microtúbulos bajo condiciones favorables para su ensamblaje. Esta solución restauró la excitabilidad perdida (Matsumoto *et al.*, 1979; 1984).

El vínculo entre integridad citoesquelética y excitabilidad implica que los potenciales de acción podrían ser afectados por casi todo agente que solubilice a los geles. Consideremos lo siguiente. Cuando axones son perfundidos internamente con KCl, los potenciales de acción menguarán progresivamente y desaparecerán dentro de los 25 a 40 minutos. Esta declinación es impactada de forma notable mediante sustituciones de iones (Tasaki *et al.*, 1965). Si el fluoruro reemplaza al cloruro durante el período de declinación, la amplitud del potencial de acción es prontamente restaurada. La sustitución por bromuro acelera el decremento. El examen de una gran cantidad de aniones demostró que la eficacia de restauración seguía la clásica serie Hofmeister (Von Hippel y Wong, 1964). Por ende, $F > HPO_4 > \text{glutamato} > SO_4 > \text{acetato} > Cl > NO_3 > Br > I > SCN$. Los aniones a la izquierda tenían la mayor tendencia a restaurar la amplitud del potencial de acción, y son los más estabilizantes. Aquellos hacia la derecha activaron más potentemente la declinación del potencial de acción y poseen la tendencia más alta a hacia la solubilización de geles.

Sin un citoesqueleto intacto, entonces, los potenciales de acción no pueden ocurrir. Los potenciales de acción parecen hallarse vinculados de algún modo a la integridad del citoesqueleto periférico. Incluso en axones normales, no tratados, cuando el citoesqueleto existente es estabilizado en mayor grado por agentes promotores de la polimerización tales como el Taxol o el dimetilsulfóxido (DMSO), la excitabilidad es realzada (Matsumoto *et al.*, 1984). Por ende, el potencial de acción parece hallarse inextricablemente vinculados a alguna característica del citoesqueleto.

¿UNA TRANSICIÓN DE FASE CITOESQUELÉTICA?

Una serie de corrientes momentáneas citoesqueléticas acompaña al potencial de acción. Una de estas corrientes momentáneas surge bajo la forma de birrefringencia, una medida óptica de estructuras ubicándose predominantemente en una dirección –longitudinalmente en el axón (Metuzals e Izzard, 1969) Dado que la corriente momentánea en forma de birrefringencia persiste luego de que el axón ha sido quirúrgicamente achatado para exprimir hacia fuera el centro citoplasmático, la fuente ha sido localizada en las estructuras longitudinales del citoesqueleto periférico (Sato *et al.*, 1973). Por ende, el citoesqueleto periférico sufre un cambio durante el potencial de acción.

Coincidiendo con este cambio ocurre una liberación transitoria de calor (Fig. 10.4). La liberación de calor durante el potencial de acción fue constatada por primera vez mucho tiempo atrás (Abbott *et al.*, 1958) y ha sido repetidamente confirmada (Tasaki e Iwasa, 1981; Tasaki *et al.*, 1987, 1989). La señal es bifásica –el calor es liberado durante la fase ascendente del potencial de acción, y es absorbido durante su fase de recuperación. La fase de absorción puede ser vista más prominentemente cuando el potasio interno es reemplazado por tetraetil amonio, una maniobra que extiende la duración del

potencial de acción por un factor de 100 a 1000. La aplicación de un breve pulso de calor supraumbral durante esta extendida meseta eléctrica puede gatillar una oscilación generando un retorno total hacia el potencial de reposo (Spyropoulos, 1961); ver Figura 10.5. Esta acción muestra que la relajación es un proceso absorbedor de calor. También ilustra el carácter crítico del proceso.

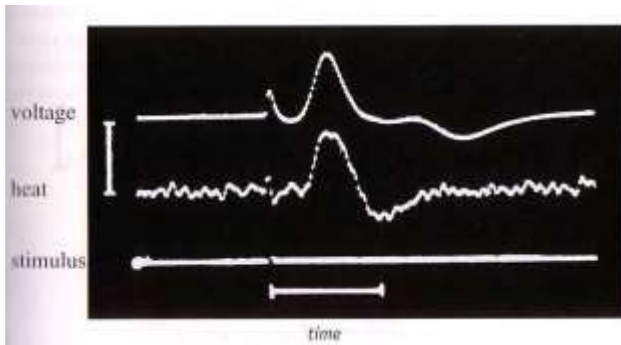


Figura 10.4. Liberación de calor acompañando al potencial de acción en el nervio olfatorio del lucio (pez). Potencial de acción (arriba), respuesta térmica (en el medio) y artefacto del estímulo (abajo). Barra vertical: 4×10^{-3} grados/segundo; barra horizontal: 20 milisegundos. De Tasaki (1988).

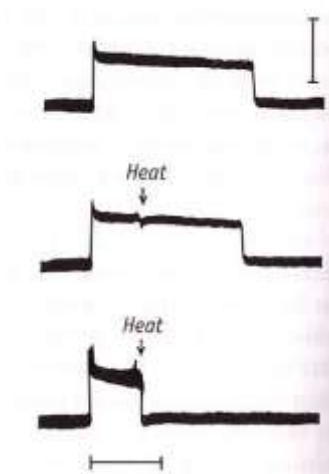


Figura 10.5. Pulso de calor aplicado durante el potencial de acción extendido en el nodo de Ranvier tratado con níquel. El pulso sub-umbral ejerce sólo un efecto transitorio (panel medio). Un pulso de magnitud apenas mayor dispara una oscilación del potencial devolviéndolo a su valor de base (panel inferior). Según Spyropoulos (1961).

Acompañando a estos cambios físicos se da una expansión celular transitoria (Fig. 10.6). La hinchazón transitoria coincidente con el potencial de acción no sólo se constata en el axón del calamar sino también en una serie de especímenes utilizando una variedad de técnicas de medición (para una revisión, ver Tasaki; 1999). Esto implica acumulación transitoria de agua dentro de la célula. Por ende, el potencial de acción es acompañado por la adsorción de agua y liberación de calor, y estas dinámicas son coincidentes con algún cambio estructural que sucede en el citoesqueleto periférico. La naturaleza crítica del disparador de calor implica que el cambio estructural bien podría ser una transición de fase.

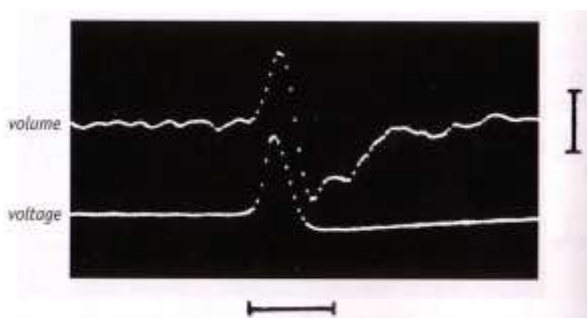


Figura 10.6. Expansión celular transitoria medida utilizando un transductor de tensión (trazo superior) en el axón del calamar. El potencial de acción correspondiente es mostrado en el trazo inferior. Barra: fuerza de expansión de 10 μg . De Tasaki (1988).

La transición de fase implica un salto entre dos estados. Resulta un desafío formidable el identificar cualquier salto semejante en el seno del breve intervalo de unos potenciales de acción, pero hay experimentos conducidos en células

con potencial de acción ampliado (como el antes citado) que confirman la bi-estabilidad. Estos experimentos emplearon un breve pulso repolarizante eléctrico (Fig. 10.7). Los pulsos repolarizantes de valor sub-umbral no obtuvieron efecto especial alguno —el potencial retornó rápidamente a su valor meseta. Pero cuando la amplitud del pulso excedió un umbral, el potencial pudo oscilar precipitadamente hacia su valor de base, tal como lo hizo con el pulso de calor (Tasaki y Hagiwara, 1957). Por ende, el potencial es estable a su nivel meseta y también a su nivel de base, pero inestable entre medio de éstos.

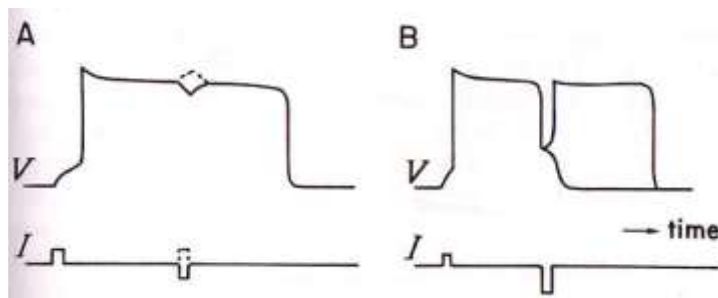


Figura 10.7. Efecto de un pulso repolarizante aplicado durante un potencial de acción extendido en el axón del calamar. Los pulsos sub-umbral evocan sólo cambios transitorios (A y el trazo superior de B). El pulso supra-umbral (B trazo inferior) evoca una oscilación hacia su valor de base. El resultado confirma la bi-estabilidad eléctrica. De Tasaki (1988).

La bi-estabilidad eléctrica ha sido confirmada repetidamente. En un experimento (Tasaki y Byrne, 1994), los contenidos del baño de perfusión fueron variados progresivamente: en cuanto la relación sodio/calcio atravesaba un umbral, el potencial del axón mostró un repentino resalto (Fig. 10.8). Similarmente crítico fue el efecto de la temperatura (Fig. 10.9): En cuanto la temperatura del baño circundante al axón del calamar fue reducida apenas por debajo de los 15 °C, el potencial intracelular tomó un viraje reversible ascendente de 50 mV (Inoue *et al.*, 1973).

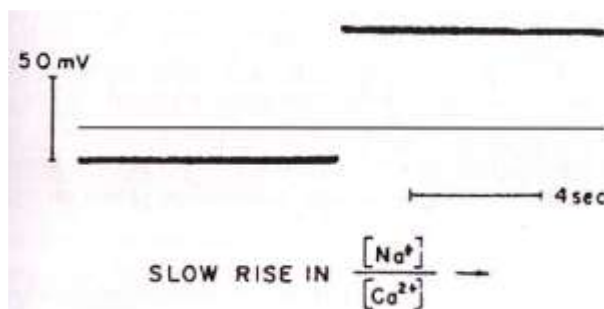


Figura 10.8. Efecto de la proporción monovalente / divalente en el axón del calamar gigante. De Tasaki y Byrne (1994).

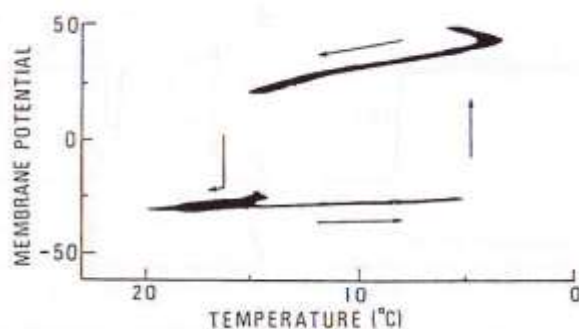


Figura 10.9. Efectos de cambios de temperatura cíclicos sobre el potencial celular del axón del calamar gigante. De Tasaki (1999b).

Tomadas conjuntamente, todas estas observaciones implican una transición eléctricamente consecucional entre dos estados estructurales del citoesqueleto. Un estado corresponde al potencial de línea de base, la otra al potencial de meseta. Del algún modo, una transición estructural en el citoesqueleto

periférico parece crear la oscilación del voltaje comúnmente conocido como el potencial de acción.

MECANISMO IÓNICO

En la búsqueda del mecanismo de cualquier transición como esta, una pista importante es el requerimiento iónico. El sodio y el potasio no pueden ser críticos porque los PA pueden ser generados, tal como lo hemos remarcado, inclusive cuando estos iones se hallan ausentes. El calcio, por el otro lado, es fundamental. Cuando el calcio es removido de la solución extracelular, los potenciales de acción son inmediatamente abolidos. Para la generación de potenciales de acción, muchos experimentos confirman el requerimiento del calcio o de un catión divalente sustituto (para una revisión, ver Tasaki, 1988).

Una forma lógica de enfocar el mecanismo de transición, por lo tanto, es la comprobación del rol del calcio. En la vesícula secretoria, el calcio condensó la matriz polimérica (Capítulo 9). Un esquema similar podría suceder en el citoesqueleto periférico. Si el calcio mantuvo la condensación del entramado citoesquelético, entonces el desplazamiento de calcio por un monovalente, el cual no puede unirse mediante enlace cruzado, podría catapultar a la expansión mencionada –al igual que en la vesícula secretoria. El entramado entonces se expandiría, y en virtud de su naturaleza más abierta el entramado expandido tendría una conductancia más alta. Los iones podrían pasar, y el potencial celular podría cambiar.

Una diferencia entre el citoesqueleto periférico y la vesícula secretoria, sin embargo, es la organización de polímeros. En las vesículas, los polímeros se hallan generalmente enmarañados. En el citoesqueleto, los polímeros se hallan covalentemente unidos por enlaces cruzados unos con otros de modo que la matriz no puede expandirse indefinidamente. Durante la expansión de la matriz, ésta almacena energía elástica, parte de la cual puede en última instancia ser devuelta al sistema. Cualquier transferencia energética semejante no necesariamente implica una máquina de movimiento perpetuo –sólo una indicación de que la energía almacenada podría ser puesta en uso para la restauración de la condición inicial y la reversión de cualquier cambio de conductancia (ver luego).

Un modo plausible por el cual el potencial de acción podría ser iniciado, entonces, es el reemplazo del calcio por un monovalente. Clásicamente, se concibe que el sodio entre al citoplasma a través de un incremento localizado en la permeabilidad mediada por receptor. En el modelo propuesto, los iones de sodio fluyen hacia dentro del citoesqueleto periférico y comienzan a desplazar al calcio. El reemplazo afloja la red, permitiéndole adsorber agua y expandirse. Con su expansión, la permeabilidad es incrementada, permitiendo más entrada de sodio, un ulterior desplazamiento de calcio, expansión adicional, etc. –como cuando se abre por rasgado una cremallera (Fig. 9.5). Mientras tanto, el sodio que ingresa conduce el potencial celular hacia un valor más positivo, estableciendo la fase ascendente del potencial de acción. Este mecanismo no difiere dramáticamente respecto de la visión clásica excepto en que la entrada del sodio tiene una función que trasciende la de meramente cambiar el potencial.

El potencial celular pronto revierte, y un obvio mecanismo a tomar en consideración es una inversión de la transición de fase. El agua debe salir y el

calcio debe volver para condensar el citoesqueleto. Algún elemento deberá impulsar el cambio: Una especulación es que la fuerza de retracción del citoesqueleto expandido y estirado podría iniciar la condensación. Con la retracción, los polímeros cercanamente yuxtapuestos podrían entonces aceptar más fácilmente los puentes de calcio, perpetuando la condensación mediante el cierre de la cremallera.

Para que un mecanismo como este funcione, la fuerza expansiva del agua adsorbida debe ceder –dado que sólo entonces podría retraerse la matriz. De hecho, el “derretimiento” del agua constituye una consecuencia aparentemente inevitable de la progresión de eventos (Fig.10.10). Durante la fase ascendente del potencial de acción, las superficies proteicas adsorben agua. También adsorben iones en competición con el agua (Capítulo 6). La adsorción de agua es limitada por la expansión de la matriz, pero el sodio continúa fluyendo en descenso por su gradiente de concentración y hacia dentro de la red permeabilizada. Los iones adsorbidos anulan la carga superficial y consecuentemente erosionan la estructuración del agua (Luck, 1976). En algún punto, el incremento de sodio adsorbido debería dañar la estructuración ácuea al punto de que la fuerza de retracción de la red triunfa frente a la expansiva fuerza del agua, y la red comienza a colapsar. Con los sitios aniónicos dispuestos en más cercana yuxtaposición, el calcio puede desplazar al sodio ligado, restaurando ambos volumen y potencial celular hacia sus valores iniciales.

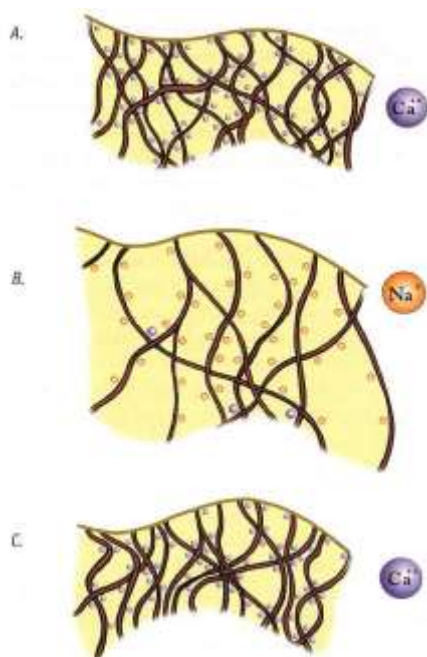


Figura 10.10. Dinámica estructural y el potencial de acción. Inicialmente (A) la red es colapsada a medida que los filamentos son puenteados por calcio. La red se expande en tanto el sodio reemplaza al calcio (B). Pero el incremento de sodio eventualmente neutraliza la carga de superficie, debilita la estructura ácuea y permite que la fuerza retractiva polimérica colapse la red (C), estadio en el cual el calcio nuevamente puede puentear con facilidad los filamentos.

Una ventaja de este mecanismo es su parsimonia –la recuperación surge a partir de los mismos eventos que general la fase ascendente. La entrada de sodio inicialmente catapulta un incremento de expansión y permeabilidad; el incremento en la permeabilidad permite que ingrese más sodio, el cual en última instancia desestabiliza la estructuración ácuea y permite que la red colapse. La recuperación es por ende inevitable. Ello explica por qué, cuando una falla efectivamente ocurre, el potencial raramente queda suspendido a un valor positivo.

El aspecto especulativo de este mecanismo es el colapso anticipado de la estructura del agua en el pico del PA. El hecho de que el agua se halle

involucrada en la recuperación es apoyado por un argumento energético. Dado que la recuperación sucede espontáneamente, el cambio en la energía libre debe ser negativo, por definición. La energía libre consiste en dos términos –entalpía y entropía. Por ende, $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$, donde ΔG es el cambio de energía libre, ΔH es el cambio de la entalpía, T es la temperatura absoluta, y ΔS el cambio en la entropía. ΔH es positivo porque el calor es absorbido durante la recuperación (arriba). Para compensar esto, ΔS debe ser muy positivo (aumentado la entropía) –implicando una pérdida sustancial de estructura durante la recuperación. Esta necesidad de pérdida no surge a partir de la desestructuración ácuea *per se*, pero el requerido tamaño del cambio entraña el involucramiento de muchas moléculas, y la cantidad de moléculas de agua supera enormemente a la de todas las otras. Por lo tanto, la probabilidad de un involucramiento del agua es alta.

El reconocimiento de que el agua juega un rol central en la generación del potencial de acción podría aportar la conclusión a la pendiente cuestión del mecanismo de acción de la anestesia general. Los anestésicos eliminan los potenciales de acción. En busca de un mecanismo, Pauling (1959) notó que muchos anestésicos generales no poseen química covalente alguna, y no forman puentes de hidrógeno. Una característica común a estos anestésicos, según él, era que estos se rodean a sí mismos de clatratos de agua, y es por ello muy probable que su acción suceda a través de esta vía. Para la generación de potenciales de acción de acuerdo con el mecanismo propuesto, el agua deberá hallarse libre para poder moverse. Toda el agua restringida por la formación de clatrato se hallará abstraída, y por tanto incapacitada para ingresar fácilmente dentro del entramado citoesquelético. En suficiente concentración cerca del axón, este agua podría eliminar del todo el potencial de acción.

Finalmente, vale la pena retornar brevemente a los clásicos experimentos de parche-abrazadera (Capítulo 1) para ver cómo aquellos resultados podrían concordar con el mecanismo de transición de fase propuesto. Imaginemos un parche –membrana más citoesqueleto- sostenido mediante una pipeta. Supongamos que una diferencia de potencial superior al umbral es impuesta a través del parche. El pulso de corriente pasando a través del parche ha sido tomado como evidencia de la apertura y el cierre de un único canal. El “canal” podría bien corresponder al ramillete de actina citoesquelética. En el axón, tales agregados se hallan distribuidos en una escala micronsima – suficientemente alejados como para admitir transiciones de fase independientes, aunque con suficiente cercanía como para permitir que un típico parche de 1- μm contenga uno o unos pocos. Entonces, corrientes cuánticas son anticipadas –un cuanto por cada agregado. Semejantes corrientes cuánticas deberían auto-detenerse: iones monovalentes ingresando al citoesqueleto en cantidad suficiente interrumpirán el flujo iónico del mismo modo en que estos detener el potencial de acción. Por ende, las corrientes del parche suceden como un pulso en vez de como un paso.

En verdad, respuestas de auto detención del parche-abrazadera deberían ser producidas por cualquier tipo de transición de fase. La transición de fase no precisa surgir fisiológicamente –podría, por ejemplo, residir en el precinto entre el espécimen y la pipeta, donde bolsillos de agua podrían atravesar una transición de fase. A medida que la acumulación de iones monovalentes dañar la estructura del agua y colapsan el bolsillo, la transición productora de corriente se auto-detendrá. Es por lo tanto comprensible el motivo por el cual

corrientes cuánticas pueden ser observadas en la extensa serie de circunstancias ilustradas en la Figura 1.3, aun circunstancias en las cuales los canales se hallan demostrablemente ausentes.

EN UN LATIDO CARDÍACO

Una forma prolija de entrelazar conjuntamente los puntos centrales de este y el anterior capítulo es considerar una situación en la cual el potencial de acción surge directamente a partir de un evento secretorio. Esto ocurre en la sinapsis, donde el neurotransmisor segregado por una célula gatilla un potencial de acción en una célula contigua. También puede suceder en el marcapasos cardíaco –el grupo celular que catapulta el latido cardíaco. Las células marcapaso son pequeñas entidades esféricas albergadas en un grupo compacto en la base de la aurícula derecha del corazón. Estas células atraviesan cambios cíclicos espontáneos en su potencial (Fig. 10.11). Cuando la despolarización traspasa un umbral, el corazón es disparado para la contracción.

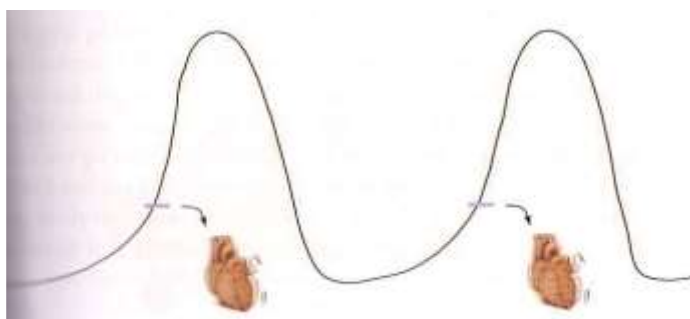


Figura 10.11. Curso temporal del potencial eléctrico en células marcapaso cardíacas. Cuando la despolarización cruza un umbral, el corazón recibe la señal para contraerse.

Se ha concebido que estos cambios de potencial espontáneos surjan a partir de una compleja sumatoria de corrientes de canal (Noble y Bett, 1993). Por otro lado, una característica típica de las células marcapaso es una abundancia conspicua de vesículas secretorias. Estas vesículas contienen altas concentraciones de catecolaminas (Trautwein y Uchizono, 1963; Callice, 1966; Cheng, 1971, Miyagishima, 1975). De hecho, la concentración de catecolamina (adrenalina, epinefrina) en células marcapaso de corazones primitivos es tan alta como la de algunas terminales de nervios. Cuando estas catecolaminas son deplecionadas experimentalmente, la función de marcapasos se detiene; cuando son restauradas, el estímulo marcapasos es reanudado (Tuganovsky *et al.*, 1973; Noda y Yugari, 1973). Por ende, las catecolaminas son imprescindibles para la función marcapasos.

Notando el requerimiento de catecolamina, yo sugerí hace algunos años que el agente responsable de la despolarización espontánea en células marcapaso podría ser el ligamiento de catecolaminas (Pollack, 1977). Después de todo, terminales nerviosas cercanas descargan catecolaminas que se ligan a las células marcapaso y aceleran la despolarización, haciendo que el corazón lata más rápido. ¿Por qué las catecolaminas segregadas desde las células marcapaso mismas podrían no lograr lo mismo (Fig. 10.12)? Las catecolaminas descargadas se ligarían a la misma o a otra célula marcapaso, disparando un cambio de fase que aumenta la permeabilidad local y permite que los cationes ingresen y despolaricen incrementadamente a la célula. Cuanto más despolarizada la célula, más alta es la tasa de descarga de catecolamina (al igual que en la terminación nerviosa), y por ende más rápida la despolarización. Una retroalimentación positiva semejante podría explicar el contorno exponencialmente ascendente del potencial del marcapaso (Fig. 10.11).



Figura 10.12. Mecanismo propuesto para la función marcapasos. Las catecolaminas liberadas desde una célula marcapaso se ligan a la misma u otra célula marcapaso, promoviendo la despolarización. Cuanto más se despolariza la célula marcapaso, más rápidamente son descargadas las catecolaminas. Esta dinámica resulta en el ascenso exponencial del potencial de marcapaso (Fig. 10.11).

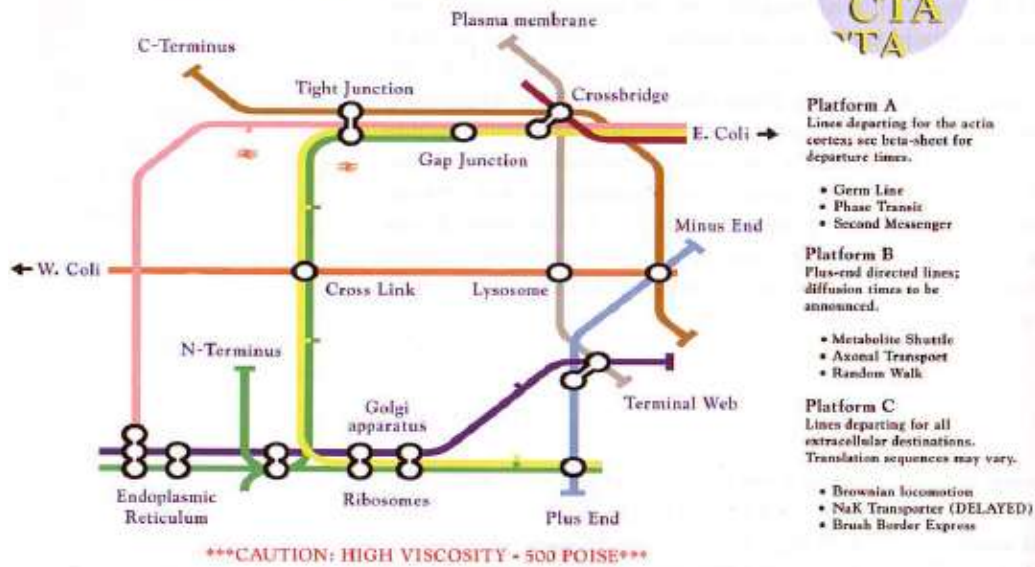
A pesar de que este mecanismo es especulativo, explica varios hechos elementales que los modelos vigentes no toman en cuenta. Explica por qué las células marcapaso se hallan densamente atestadas de catecolaminas. Da cuenta del requerimiento absoluto de catecolaminas para la función de marcapasos. Explica por qué el influjo marcapasos inducido por epinefrina puede estar asociado con cambios cíclicos de volumen (Tasaki, 1998). Y entrelaza los conocidos efectos de catecolaminas descargadas por neuronas con catecolaminas descargadas a partir de fuentes internas: ambas promueven la despolarización del marcapasos mediante la misma vía. El mecanismo entonces extrae el proceso de marcapasos del ámbito de la exclusividad y lo sitúa en el ámbito de la acción sináptica común.

CONCLUSIÓN

El mensaje de este capítulo y el anterior es que los mecanismos de comunicación de la célula podrían estar gobernados por transiciones de fase. La generación de secreción y de potenciales de acción se basa en la dinámica de matrices poliméricas negativamente cargadas –condensadas por cationes divalentes y decondensadas por cationes monovalentes. En la matriz secretoria la transición descondensante se dirige al acabamiento, con la red expandiéndose completamente y en algunos casos, irreversiblemente. En la matriz citoesquelética la transición no perdura hasta la terminación porque los polímeros matriciales se hallan covalentemente unidos mediante enlaces cruzados y la matriz no puede expandirse indefinidamente; la transición es por tanto fácilmente revertida. Temáticamente, sin embargo, los dos mecanismos son similares –y resulta notable el hecho de que dos mecanismos tan parecidos surgieran a partir de investigadores mutuamente tan desconocedores de sus respectivos enfoques.

Cellular Transit Authority

Route and usage information



In consideration of other patrons:

no apoptosing
no endocytosing
no secretion
fine for public meiosis: \$500
absolutely no focal adhesion

Please place unused metabolites in the designated lysosomes.
Thank you for keeping your Golgi bodies to yourself.

We realize you have a choice of fundamental biological hypotheses; we'd like to thank you very much for riding with us.

- the management

CAPITULO 11: TRANSPORTE

Habiendo considerado la comunicación, nos movemos a continuación hacia un proceso al menos igualmente fundamental –el transporte. Sin un transporte de materiales, la célula no puede metabolizar, moverse, secretar o dividirse. El transporte de material es central para la función celular.

En principio, los requerimientos de transporte pueden ser cumplidos a través de la difusión. Pero la difusión carece de direccionalidad; y es lenta. La célula depende en lugar de ello de procesos vectoriales que transportan sustancias activamente desde un lugar a otro, de los cuales la versión más primitiva es el “flujo”. El flujo es un análogo arcaico de la circulación sanguínea; arrastra sustancias como si estas circularan suspendidas en un manantial fluyente. El flujo es un vehículo de elección en células tanto vegetales como animales abarcando desde las más primitivas hasta las más diferenciadas –desde algas, amebas y bacterias hasta llegar a las neuronas humanas.

Este capítulo explora el mecanismo subyacente del flujo. Consideramos si la clave radica en una transición de fase tal como una de las presentadas en los últimos pocos capítulos. La significancia de esta exploración se extiende más allá del flujo *per se*, porque el fenómeno de flujo es suficientemente primitivo como para que cualquiera sea el principio subyacente que aquí se debele éste bien podría ser genérico para procesos relacionados.

LA ORGANELA

La organela del flujo es bastante simple. Consiste en un manajo de filamentos conteniendo tres elementos esenciales –actina, miosina y agua.

La actina es el bloque de construcción primario. Monómeros de actina de forma globular de alrededor de 5 nm de diámetro se vinculan unos con otros para crear una “hebra de perlas” y dos de estas hebras se entrelazan formando el filamento (Fig. 11.1). Los filamentos de actina raramente existen aislados, y la organela de flujo no es ninguna excepción. A través de proteínas conectoras transversales tales como la alfa-actinina, la filamina y la vilina, los filamentos se lían en un conjunto paralelo.



Figura 11.1.
Estructura molecular
del filamento de
actina.

La actina es una proteína excepcional tanto en ubicuidad como en función. Su presencia ha sido documentada en quizás toda célula eucariótica examinada hasta la fecha, implicando un rol central en la función celular. Y en tanto que la mayoría de proteínas típicamente evoluciona hacia numerosas isoformas función-específicas, la actina ha permanecido resistente al cambio; existen relativamente pocas isoformas viables. Una consistencia tal implica una función tan delicada que aún un cambio estructural conservativo podría tornarla inoperante. La actina no parece ser un bastón inerte.

El segundo componente del sistema es el agua. El agua, como sabemos, se auto-organizará alrededor de las superficies proteicas. La superficie de la actina parece ser especialmente adecuada, ya que los filamentos de actina gelifican prácticamente con el chasquido de un dedo, implicando una alta capacidad absorbente de agua (Capítulo 8). Incluso gradientes osmóticos enormes no son capaces de extraer el agua del gel de actina (Ito *et al.*, 1992). Más aún, se confirmó mediante observaciones microscópicas que el manojito de filamentos de actina está encaquetado por una zona clara extendiéndose hacia fuera tan lejanamente como alrededor de 1.000 nm desde la superficie del manojito, desprovista de cualquier material particulado (Kamitsubo, 1972). La exclusión de solutos nuevamente implica una alta capacidad de estructuración acuosa.

La firmeza de la estructuración del agua es inferida también a partir de la micrografía electrónica de la Figura 11.2. Aquí la actina globular fue infundida dentro de un músculo. La actina globular polimerizó dando una actina filamentosa, formando una construcción geliforme. La fuerza del enlace actina-agua aparentemente fue lo suficientemente fuerte como para que el entramado músculo-filamento fuera escindido, tal como se muestra.

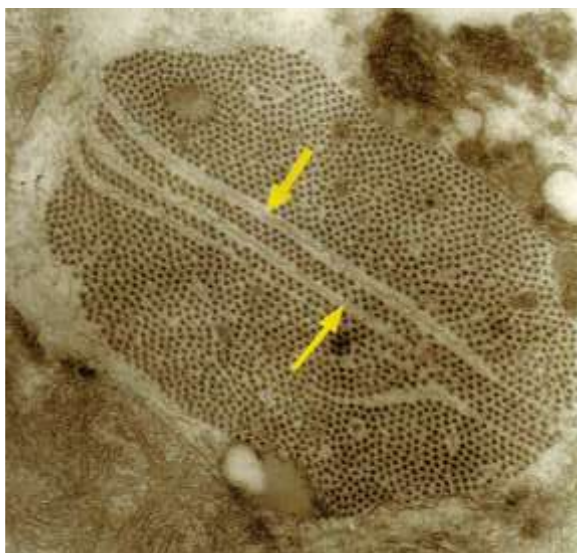


Figura 11.2. La polimerización de la actina crea una fuerza lo suficientemente fuerte como para resquebrajar el entramado de filamentos musculares (flechas). Micrografía cortesía de Károly Trombitás.

La proclividad de la actina hacia la estructuración del agua es también consistente con su resistencia al congelamiento. Una solución acuosa de propanodiol y glicerol habitualmente se congelará con facilidad. Cuando se aumenta en sólo un 0,5% el contenido de actina filamentosa (más un 0,1% del conector transversal alfa-actinina), la solución no se congelará incluso bajando a temperaturas de nitrógeno líquido (Prulière y Douzou, 1989). Los filamentos aparentemente organizan el agua en una configuración que es difícil de convertir en hielo. La ínfima cantidad de actina requerida para conseguir esta resistencia es contundente.

La firme estructuración del agua podría explicar algunos de los rasgos distintivos bien reconocidos de la actina. Entre las proteínas, la actina es famosa por su “pegajosidad” –los bioquímicos afirman que se vincula prácticamente con cualquier cosa a la vista. La cantidad de proteínas vinculantes con actina identificada hacia mediados de la década de 1980 totalizó más de 60 –además de aquellos solutos respecto de los cuales es conocida su vinculación no específica con la actina (Pollard, 1984). Dado que los solutos son excluidos desde el agua estructurada, serán forzados a

desplazarse en cualquiera de dos direcciones: hacia el agua suelta, o hacia la superficie proteica –lo que sea para evitar el medioambiente de agua estructurada. Las proteínas con el máximo de solutos adsorbidos a superficie, por ende, serán aquellas que estructuran el agua más extensivamente. De ahí, la “pegajosidad” legendaria de la actina.

La firme estructuración del agua también podría hallarse ligada a la resistencia a la mutación de la actina. La estructura molecular de la actina ha permanecido infrecuentemente consistente a lo largo de los eones. Si resulta que la función de la actina está vinculada a su capacidad para la estructuración acuosa (ver luego), entonces la consistencia evolutiva de la proteína podría ser comprensible, ya que la capacidad para la estructuración del agua es críticamente dependiente de la distribución de carga superficial y por ende, las alteraciones inclusive modestas podrían desfuncionalizar la proteína. Esta interpretación sitúa a la estructuración del agua en el centro del escenario –una posibilidad que será tenida en cuenta.

El tercer componente del sistema de flujo es la miosina. A diferencia de la actina, la miosina se presenta en numerosas isoformas y familias, entre las cuales las más comunes son la miosina-1 y -2. La miosina-2 es la variedad más formadora de filamentos que aparece en el músculo y en otros lugares, mientras que la miosina-1 y algunas de las miosinas de más alta numeración son formas minúsculas. Es la forma diminutiva la que predomina en el sistema de flujo. Al parecer la miosina es requerida para la iniciación del flujo.

La esencia del sistema es entonces bastante simple: Los filamentos de actina unidos mediante enlace cruzado en un manojo paralelo; espacios en el seno del manojo llenados con agua estructurada; y la miosina asociada con la actina (Fig. 11.3). La organela está habitualmente situada en la periferia de la célula, donde el flujo es prominente. Inclusive cuando se lo aísla, este sistema de organela puede propulsar materiales a lo largo de su longitud.

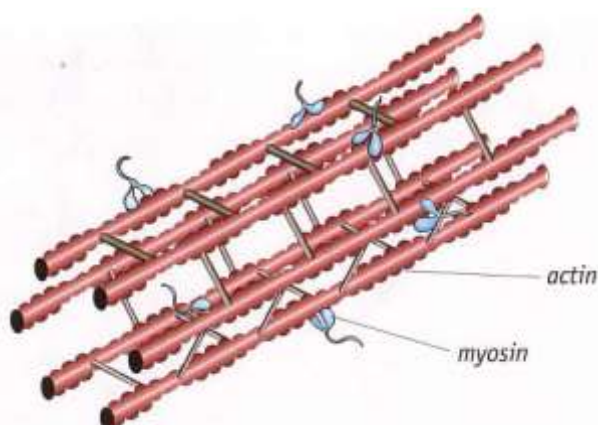


Figura 11.3. Junto con el agua estructurada, la organela de flujo consiste en filamentos de actina vinculados mediante conectores transversales, interactuando con miosina.

¿UNA TRANSICIÓN DE FASE?

El flujo de materiales a lo largo del manojo de filamentos podría ser inducido por algún tipo de transición de fase. Las transiciones de fase median cambios en ambos solvente y solutos (Capítulo 8). Por lo tanto, resulta previsible que una transición de fase de actina produzca algún tipo de desplazamiento de soluto, y si la transición llegase a propagarse a lo largo del manojo de filamentos, los solutos podrían desplazarse vectorialmente.

Se sabe a ciencia cierta que el cambio estructural efectivamente se propaga a lo largo del manojos de filamentos de actina. Manojos fluyentes extractados de células internodales de *Nitella* y *Chara* muestran vigorosas ondulaciones que se propagan de un extremo al otro (Kuroda, 1964; Kamitsubo, 1972). Estas ondulaciones son particularmente conspicuas en especímenes doblados que forman polígonos cerrados. Pese a que el material está fijado en el espacio, los vértices del polígono se propagan incesantemente a lo largo del perímetro a razón de unos 10 $\mu\text{m}/\text{seg}$. (Fig. 11.4). De esta forma, una ondulación propagándose es visualizable directamente.

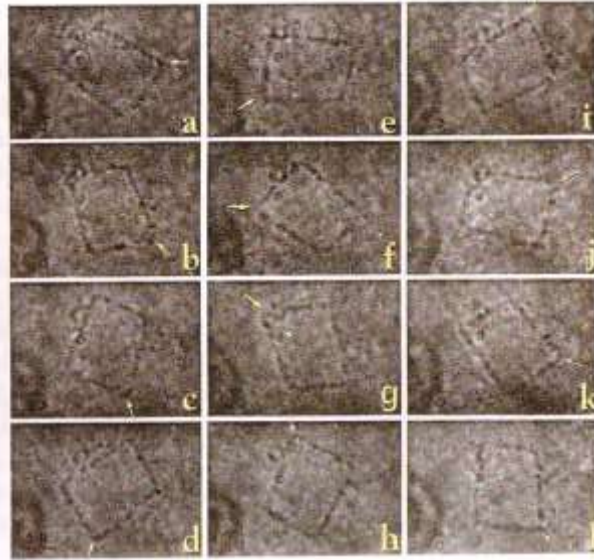


Figura 11.4. Los vértices del manojos de filamentos de actina se propagan alrededor del polígono (flechas) el cual de otro modo permanecería estacionario. De Kuroda (1964).

La base estructural de semejante ondulación fue estudiada en el moho del cieno *Physarum* (Hatano, 1972). Los filamentos de actina re-sintetizados a partir de proteínas del sistema de flujo adoptaron cualquiera de dos configuraciones estructurales dependiendo del nivel de ATP y potasio –una configuración lineal, o una configuración más corta, más flexible con múltiples rizados (Fig. 11.5). Esta observación supuso que la ondulación podría depender del plegamiento local de los filamentos, el cual podría acortar localmente el filamento. Es más, los manojos fluyentes aislados muestran oscilaciones de longitud espontáneas del orden de $\sim 10\%$ (Kamiya, 1970), confirmando su implicada aptitud para el acortamiento.



Figura 11.5. Estados corto y largo de la actina. Según Hatano (1972).

Las ondulaciones también son observables en filamentos de actina individuales tales como los que conforman el manojo. Conocidas como “reptación” debido a su carácter serpiginoso, las ondulaciones son observadas en términos generales: en filamentos suspendidos en solución (Yanagida *et al.*, 1984); en filamentos incrustados en un gel (Käs *et al.*, 1994); y en filamentos deslizándose sobre una superficie recubierta con miosina (Kellermayer y Pollack, 1996). Se supuso que estas ondulaciones de semejante tendrían un origen termal. Pero esa noción fue puesta en duda por la observación de que las ondulaciones pudieron ser intensificadas sustancialmente mediante la exposición a ligandos tales como la miosina (Yanagida *et al.*, 1984), como asimismo por el ATP (Hatori *et al.*, 1996). Estas acciones implicaron un cambio estructural específico más que un cambio termalmente inducido.

De hecho, existe un largo historial de evidencia respecto del cambio estructural de la actina. Las transiciones moleculares fueron primeramente notadas por Oosawa y colegas en la década de 1960 (Asakura *et al.*, 1963; Hatano *et al.*, 1967; Oosawa *et al.*, 1972). Los monómeros de actina sufrieron una rotación de 10° ante su exposición a miosina (Yanagida y Oosawa, 1978). Los cambios conformacionales de la actina fueron desde entonces confirmados repetidamente: en estudios de sondeo, estudios de difracción de rayos X, estudios de fosforescencia-anisotropía, y estudios de transferencia de energía de fluorescencia –este último mostrando un cambio del 17% en el espaciamiento de repetición de actina ante la exposición a miosina (Miki y Koyama, 1994). Llamo vuestra atención hacia la Figura 11.6, una sucesión temporal que ilustra el cambio desde un filamento recto hacia un filamento ondulado. Una evidencia adicional respecto del cambio estructural de la actina es considerada en dos revisiones recientes (dos Remedios y Moens, 1995; Schutt y Lindberg, 1998).

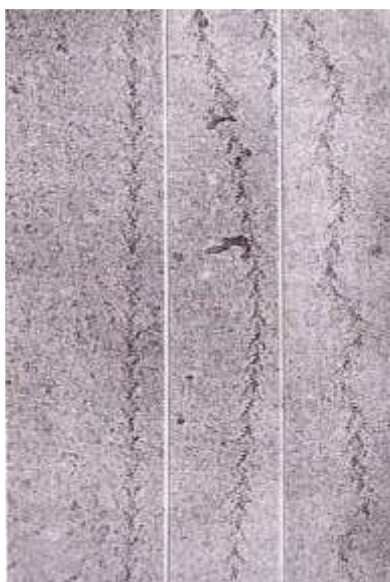


Figura 11.6. Filamentos de actina decorados con fragmentos de miosina S1, preparados obtenidos por congelamiento relámpago de sucesivas etapas (izquierda a derecha) tras la exposición a un análogo del ATP. Nótese el progresivo aumento de la ondulación del filamento. De Ménétret *et al.* (1991).

Diversos estudios indican que el cambio estructural se propaga a lo largo del filamento. La gelsolina es una proteína que se liga al filamento de actina en uno de sus extremos (el denominado extremo “barbado”). Sin embargo el impacto de la unión en la punta es sentido a lo largo del filamento entero (Fig. 11.7): Las orientaciones moleculares se desplazan en unos 10° y hay una disminución triple en la rigidez de torsión global del filamento (Prochniewicz *et al.*, 1996). Por ende, el cambio estructural inducido en el extremo se propaga demostrablemente por la totalidad del filamento. Semejante acción de propagación podría ser responsable por la curvatura que progresa a lo largo del

manejo fluyente (Fig. 11.4). Podría crear las ondulaciones habitualmente observadas a lo largo de filamentos de actina individuales. Estas ondulaciones parecen propagarse –como se halla confirmado mediante la correlación cruzada de los desplazamientos de punta (deBeer *et al.*, 1998), y por marcadores de fluorescencia para el rastreo distribuidos a lo largo de la longitud del filamento (Hatori *et al.*, 1996b, 1998).

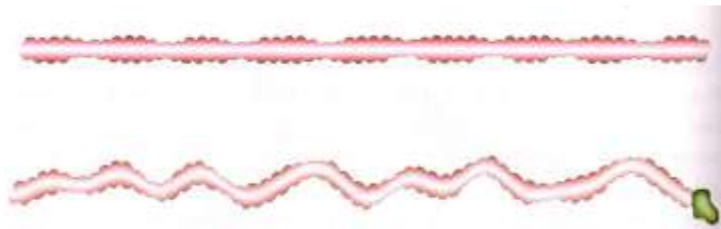


Figura 11.7. La unión de la gelsolina a un monómero de actina induce un cambio conformacional en la totalidad del filamento.

¿Podría una transición estructural de propagación llevar los solutos a fluir a lo largo del manido –tal como fuera sugerido anteriormente por Szent-Györgyi (1972)?

¿CAMBIO ESTRUCTURAL DEL AGUA?

Un posible mecanismo para la conducción de solutos podría residir en los rasgos distintivos organizacionales del agua. El agua en el estado estructurado tiene una viscosidad alta y geliforme, lo cual impide el flujo. Si las sustancias han de fluir activamente, una apuesta prometedora es un cambio en la estructura del agua.

Un cambio semejante es un predecible acompañamiento para la transición de fase. Una firme estructuración del agua surge a partir de una oportuna distribución de la carga de superficie (Capítulo 4). Si la transición de fase perturba esta distribución, la efectividad citada deberá disminuir y el agua tenderá a desestructurarse. En términos químicos, la superficie de la actina se torna menos hidrofílica (más hidrofóbica) y adsorbe conmensurablemente menos agua. A medida que la proteína se pliega, ya sea por interacción proteína-proteína o en el caso de la actina posiblemente por la formación de puentes de calcio entre las superficies aniónicas cercanas (Tang y Janmey, 1998) –la distribución de cargas es alterada y muchas menos cargas de superficie son expuestas al agua (ver Fig. 8.7). Por ello, el agua se des-adsorbe.

La evidencia sobre la des-adsorción del agua proviene del comportamiento de los geles de actina. Los geles de actina atraviesan transiciones de fase masivas del tipo todo-o-nada, y mientras esto sucede el agua sale (Fig. 11.8). La extensión de la pérdida de agua es impresionante en tales geles aleatorios, y también en geles orientados más linealmente donde la transición hace caer la proporción agua-a-proteína desde 50:1 hasta 1:1 (Szent-Györgyi, 1951). La proteína transicionada es prácticamente deshidratada –de forma bastante igual a como ocurre en el citoesqueleto periférico y la vesícula secretoria.

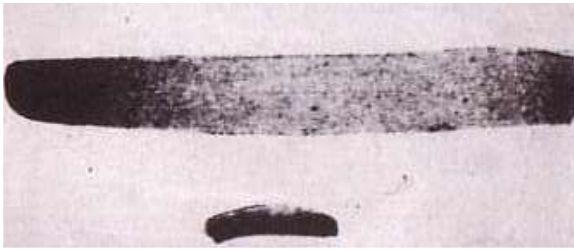


Figura 11.8. La exposición de un gel de actina a una concentración crítica de ATP induce una masiva contracción y la liberación de agua.

Si esta evidencia respecto de la liberación del agua parece demasiado técnica, consideren la experiencia común de comer sashimi. El sashimi es músculo de pescado crudo, el cual contiene actina en abundancia. Precisamente del mismo modo en que la actina retiene agua, así lo hace el sashimi –como también otros pescados y carnes frescos. En Japón, es posible obtener sashimi que está particularmente fresco, y mi amigo el Profesor Ogata buscará obstinadamente semejante manjar. Él relata que una medida de su frescura es la prueba del palillo chino: el sashimi que está genuinamente fresco se contraerá ante el contacto. Y cuando se contrae, el agua sale chorreando.

En suma, los filamentos de actina poseen una propensión inusualmente alta hacia la estructuración del agua, y mientras los filamentos sufren una transición de fase esta capacidad se pierde. El agua estructurada entonces se desadsorbe, y revierte a agua suelta. En cuanto la transición de la actina se propaga a lo largo del filamento, así también deberá hacerlo la transición del agua. Una ondulación propagándose deberá por tanto rodear el cambio compuesto –incluyendo a ambos, polímero y agua asociada (Fig. 11.9).

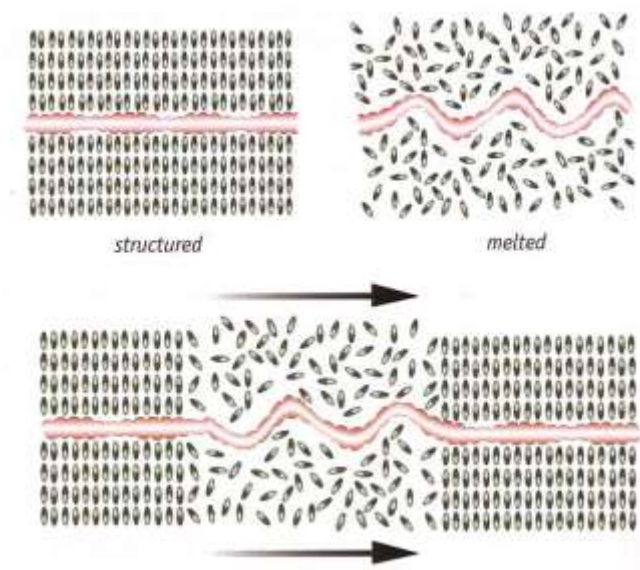


Figura 11.9. Los dos estados de la actina. En el estado extendido, el agua vecinal es estructurada (izquierda); en el estado plegado, esta se halla desestructurada (derecha). Un cambio en propagación (abajo) involucrará a ambas actina y agua.

HACIA UN MECANISMO

¿Podría el escenario de la Figura 11.9 conducir al flujo? Consideren una analogía. Con el propósito de ilustrarlo, imaginen que el agua estructurada es reemplazada por hielo. Supongan que un manojo de robustas barras interconectadas de 3 metros de largo es sumergido completamente en un barril conteniendo agua sucia, y el citado recipiente es embarcado hacia el Ártico. El agua se congelará. Al congelarse el agua y crecer los cristales de hielo, los escombros serán empujados afuera del entramado de hielo y hacia la interfaz más cercana –ya sea la superficie de las barras o bien la superficie del tanque; y allí permanecerán indefinidamente (Fig. 11.10A).

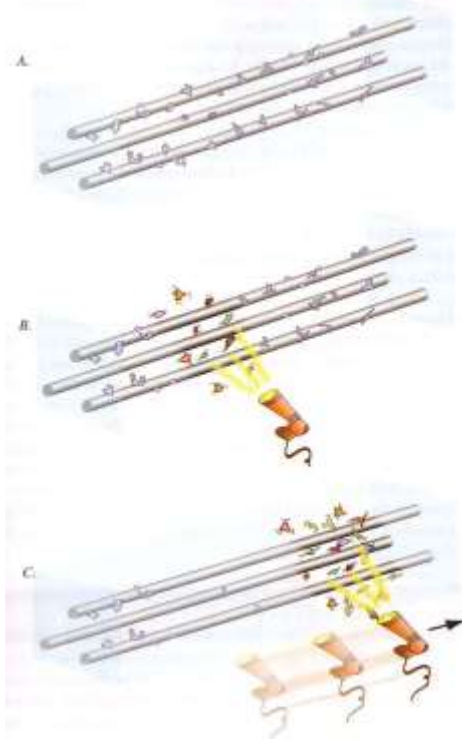


Figura 11.10. Analogía de las barras de metal (filamentos de actina) inmersas en hielo (agua estructurada). Los solutos se acumulan en la zona derretida. Al desplazarse la zona de derretimiento, también lo hacen los solutos.

Ahora supongan que se aventuraron audazmente hasta esta remota estación experimental armados con una pistola de calor y quizás también un rifle para eludir osos polares. Apuntan la pistola de calor hacia algún punto a lo largo del ensamble de barras congelado y derriten el hielo (Fig. 11.10 B). Al derretirse el hielo, el escombros es liberado hacia el agua disuelta. Apaguen la pistola de calor y el frío ártico conducirá el escombros de vuelta hacia las superficies de las barras.

En lugar de meramente sostener fija la pistola de calor, supongan que la arrastran lentamente a lo largo de la estructura. El hielo se derretirá, pero debido a que el experimento se realiza en las lejanas localidades del Ártico, el agua rápidamente se re-congelará en la estela del desplazamiento de la pistola de calor. Un frente de re-congelamiento seguirá rápidamente por detrás del frente de deshielo, dejando una “ventana” de agua derretida con residuos, desplazándose a lo largo del conjunto (Fig. 11.10 C). Al moverse la ventana, también lo hará la suciedad.

La analogía entre este sistema y el sistema de la actina debería, así lo espero, ser clara. En el sistema de actina no es la pistola de calor en marcha lo que impulsa el derretimiento sino la transición de fase. La transición “derrite” el agua local hacia agua suelta, creando una ventana en cuyo seno pueden hallarse suspendidos los solutos u organelas. Al moverse la ventana, también lo hacen los solutos. Estos solutos efectivamente fluyen a lo largo del conjunto de filamentos de actina. Una diferencia entre los dos sistemas es que el agua estructurada es menos excluidora de solutos que el hielo. A veces los solutos pueden escapar de las garras de la ventana en marcha y de ese modo permanecer estacionarios –hasta ser capturados por una ventana subsecuente. Por lo tanto, el transporte ocasionalmente debería cesar, y luego retomar la marcha a una máxima velocidad –una modalidad denominada “saltarina”, que es, de hecho, un rasgo distintivo común de este proceso.

El principio de transporte delineado aquí podría parecer poco ortodoxo, pero se ha tornado estándar en el ámbito de la ingeniería aplicada: es utilizado en un

proceso denominado “refinamiento de zona”. El escenario es bastante parecido al experimento del Ártico. Una barra de cristal es derretida localmente mediante exposición al calor (Fig. 11.11). Las impurezas dentro de la barra prefieren la región derretida a la región cristalizada, de modo tal que al barrer el calentador a lo largo de la barra para crear ventanas de derretimiento en movimiento, las impurezas se trasladarán asimismo, eventualmente acumulándose en el extremo de la barra para su evacuación. El método es extremadamente efectivo. Con repetidos barridos, puede obtenerse una purificación de la barra del orden de 10^{10} –lo cual tornó práctica la fabricación del primer transistor de germanio (Pfann, 1962, 1967). El principio de la ventana de derretimiento en movimiento es bastante igual al propuesto para el transporte basado en actina.

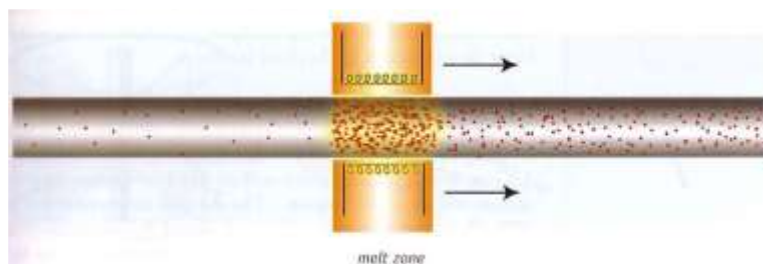


Figura 11.11.
Principio de la
refinación de zona, o
derretimiento de zona

Dada esta similitud de principios, valdría la pena mirar hacia esta contraparte maquinada en busca de pistas respecto de la energética. En el derretimiento de zona, el aporte de energía es usado para transformar la barra cristalina desde un estado al otro, de sólido a derretido. Si se solicitase un principio similar para con el flujo, la energía sería utilizada para “derretir” el complejo de actina-agua. Debido a que las moléculas de agua superan en número a las de actina en más de 100.000 veces (55 M vs. 200 – 400 μ M), la transición del agua dominaría probablemente el paisaje energético, a menos que resultara siendo energéticamente inconsecuente. Una gran parte de la energía, en otras palabras, sería usada para llevar a cabo el cambio antrópico en el agua. Una posibilidad semejante será considerada con más detalle en el Capítulo 15, momento hacia el cual el material de los capítulos intermedios podrá ser llevado a versar sobre el tema de la energética en general. Para entonces, también estaremos en posición para considerar el rol del ATP.

Hasta ahora, el foco se ha centrado sobre los solutos. Pero surge la cuestión respecto de si los solutos son sólo los biológicamente transportados, o si también lo es el solvente. A pesar de que el “flujo” parecería implicar un movimiento del fluido, las moléculas de agua no pueden ser divisadas por el microscopio óptico, por lo que las observaciones estándar de partículas fluyentes no necesariamente implican que el agua fluya. De hecho, el agua sí fluye. Esto está confirmado en experimentos sobre manojos fluyentes aislados. Cuando el manojito de filamentos es suspendido en aire húmedo, se forma una gotita cada vez mayor en el extremo distal (Wohlfarth-Botterman, 1964).

¿Qué impulsa el agua a fluir? Inevitablemente, el agua deberá moverse con los solutos porque los solutos se hallan en sí mismos rodeados por nubes sustanciales de agua estructurada (Capítulo 6). Al moverse el soluto también deberá hacerlo la nube. Este mecanismo pasivo podría, no obstante, no ser el único. El agua también puede ser transportada por una frontera hidrofílica-hidrofóbica móvil similar a la que es creada por la transición de fase.

El principio es ilustrado de la mejor manera por dos demostraciones (Fig. 11.12). La primera involucra un gradiente espacial de hidrofobicidad de superficie (arriba) establecido mediante la exposición de una "hostia" de silicona pulida al frente de difusión de un vapor de silano. Una gotita de agua puesta sobre esta superficie se traslada continuamente hacia la región más hidrofílica. La gotita puede incluso moverse cuesta arriba (Chaudhury y Whitesides, 1992). Una segunda demostración (abajo) emplea una frontera hidrofílica-hidrofóbica discreta montada mediante el empalmado de superficies hidrofílicas e hidrofóbicas borde a borde. Una gotita de aceite puesta sobre la frontera se traslada abruptamente hacia el lado hidrofóbico (Suzuki, 1994). Estas demostraciones confirman que gradientes de hidrofobicidad de superficie similares a aquellos con una previsible propagación a lo largo de los filamentos de actina (Fig. 11.9) son suficientes como para impulsar un flujo de fluido paralelo a los filamentos.

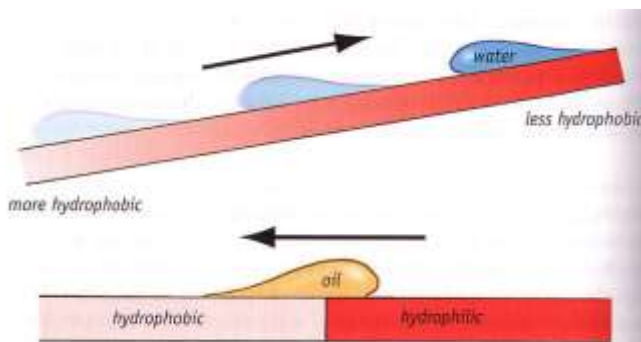


Figura 11.12. Principio del movimiento de fluido a lo largo de una superficie conteniendo un gradiente hidrofílico-hidrofóbico.

Finalmente, es difícil abandonar este tema sin mencionar que dispositivos funcionales fructuosos han sido construidos a partir de componentes biológicos del sistema de flujo re-ensamblados (Fig. 11.13). Los filamentos orientados de manera adecuada pueden crear una corriente de flujo continua (A). Y del mismo modo en que la fuerza de una hélice giratoria puede mover una lancha mediante el empuje ejercido sobre el agua, la fuerza reactiva de la propulsión acuática del filamento de actina puede poner un eje a generar trabajo (B). Si alguno de tales mecanismos reemplazará al motor de los automóviles resulta algo cuestionable. Sin embargo, estas demostraciones sí ilustran que el mecanismo de flujo no es mágico en modo alguno; es un proceso primitivo impulsado por unos pocos componentes biológicos simples.

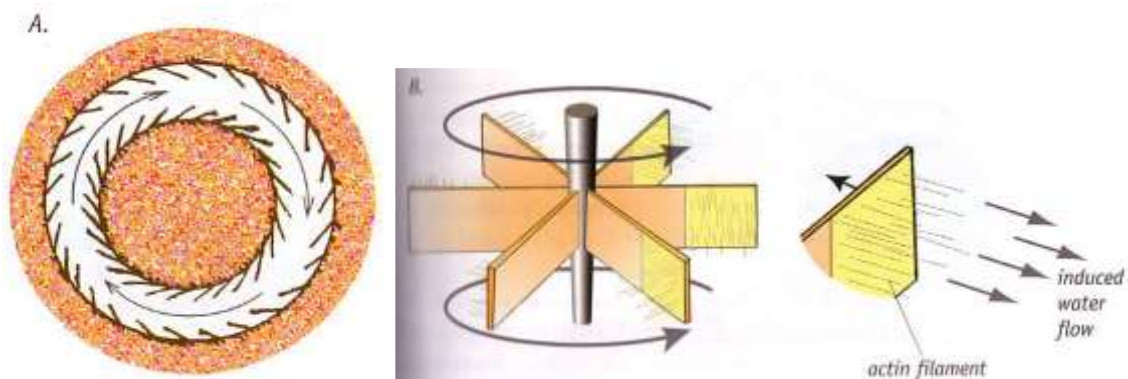


Figura 11.13. Máquinas de flujo construidas en base al principio del flujo de actina. A: (según Yano *et al.*, 1978). La brecha entre cilindros concéntricos contiene filamentos de actina orientados como se muestra. La adición de ATP y meromiosina pesada induce el flujo en la dirección de la flecha. B: (según Yano *et al.*, 1982). Los filamentos de actina están orientados como se muestra. Cuando el ATP y la meromiosina pesada son adicionados a la solución conteniendo los remos, la hélice gira.

A continuación nos dirigimos más allá del mecanismo de flujo hacia las aplicaciones biológicas.

Primero exploramos la migración celular y luego el transporte de solutos a través de la frontera celular. Para cada uno de estos procesos consideramos si el mecanismo de transición de fase propagatoria anteriormente delineado provee una explicación adecuada.

MIGRACIÓN CELULAR

La migración es un proceso común en todas partes de la filogenia, desde la ameba en busca de nutrimento hasta el fibroblasto migrando hacia el sitio de una herida para depositar colágeno. Los procesos migratorios involucran a bultos de filamentos de actina, aunque el modo de participación no está bien comprendido.

Consideremos la migración en la ameba. La ameba reptará en la dirección más apropiada para proveerse el sustento. La fuente de sustento provee una señal quimiotáctica a la cual la célula responde mediante el brote de un pseudópodo dirigido apropiadamente (Fig. 11.14). El incipiente pseudópodo primero anda a tientas torpemente hasta que puede aferrarse. Luego procede a crecer en longitud y circunferencia a través de arrastrar hacia su interior la mayor parte del cuerpo de la célula. A través de la transferencia de masa, el pseudópodo crece hasta que se vuelve indistinguible de la verdadera célula. El centro de la masa celular efectivamente se desplaza hacia un locus más cercano al sitio de alimentación.

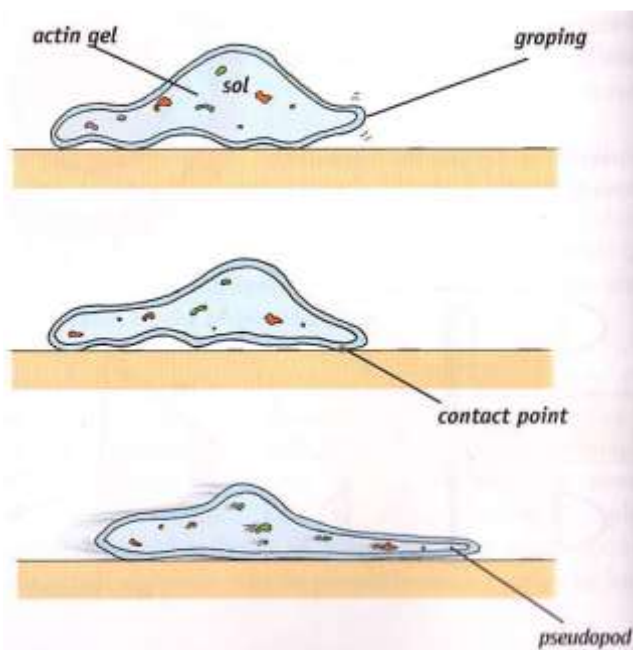


Figura 11.14. La ameba se mueve al transferirse la masa desde el cuerpo celular hacia el pseudópodo.

El crecimiento del pseudópodo requiere un continuo abastecimiento de materiales de construcción desde el cuerpo celular. Sin “ladrillos y cemento” no es posible crecimiento alguno –por lo tanto, ningún movimiento. Para satisfacer la demanda de materiales, la célula necesita un mecanismo de transporte, y los mecanismos sugeridos por los libros de texto abarcan desde los gradientes espaciales de presión osmótica hasta el estrujado de contenidos celulares mediante contracción regional. Estos mecanismos tan *ad hoc* parecen cuanto menos lo necesario, sin embargo, ya que el flujo en células ameboides (y en muchas otras) es un prominente rasgo distintivo que continúa siendo evidente

aún cuando el citoplasma es removido de la célula e insertado dentro de capilares de vidrio (Allen *et al.*, 1960). En la ameba, el flujo se halla íntimamente ligado a manojos de filamentos de actina periféricos. La presencia del flujo está más allá de todo cuestionamiento; el único interrogante es si el trabajo de transporte realizado por los manojos de actina obvian completamente la necesidad de procesos *ad hoc* suplementarios cualesquiera.

Con el mecanismo de transporte de la actina, elseudópodo recibiría sus materiales de construcción de una manera semejante a una cinta transportadora. Entre los materiales, el más esencial es la proteína del almacén, la actina. La actina se halla disuelta en su forma monomérica en el centro de la célula –se acumula allí en tanto los filamentos posteriores de la célula son disueltos por la gelsolina. De este modo, abundantes monómeros de actina deberían impregnar la corriente que fluye a lo largo del manajo (Fig. 11.15). Los monómeros en flujo que llegan hasta los extremos receptivos (positivos) de los filamentos, pueden polimerizar. Al alargarse los filamentos de actina, conformarán la estructura del incipienteseudópodo, perpetuando el transporte de los constituyentes necesarios para el crecimiento y la extensión. Este es un proceso vectorial auto-sustentable que asegura el crecimiento en una dirección consistente.

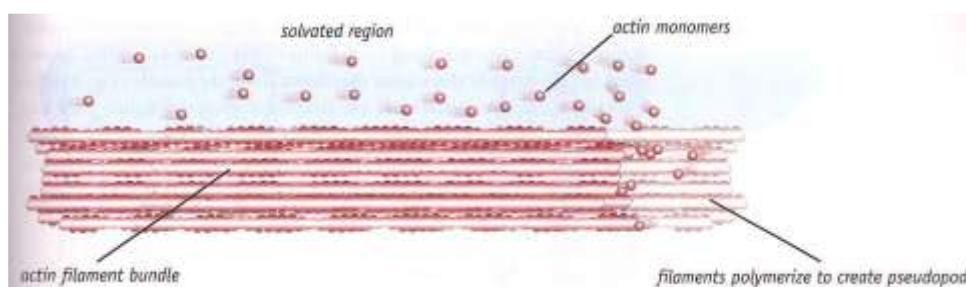


Figura 11.15. Los filamentos de actina se polimerizan mientras los monómeros fluyen hacia el extremo positivo.

El crecimiento delseudópodo es por tanto un inevitable rasgo distintivo del citoesqueleto periférico. En tanto que una señal quimiotáctica o bien de otro tipo estén presentes para disparar la propagación, elseudópodo crecerá y la célula migrará. Para que todo esto suceda, la célula requiere poco más que unos manojos de actina.

TRANSPORTE A TRAVÉS DE LA FRONTERA CELULAR

Una implicación de este simple vínculo entre estructura y función es que la mera presencia de un manajo de filamentos de actina debería proveer motivos suficientes como para sospechar el flujo. Muchas organelas contienen manojos de actina. Sólo raramente se ha sugerido que tales organelas podrían operar a través de un mecanismo de flujo (Oplatka, 1998).

Un caso obvio en el cual los manojos de filamentos de actina son prominentes es el del sarcómero muscular. Cuando los manojos de actina sarcoméricos son expuestos a miosina y ATP solubles, el flujo es inmediatamente iniciado (Tirosh y Oplatka, 1982). Por lo tanto, la actina muscular apoya el flujo. De hecho, es la actina muscular la que impulsa las máquinas de flujo de la Figura 11.13. Estas observaciones implican que el principio de propulsión del agua bien podría hallarse incorporado dentro del sarcómero en funcionamiento (Capítulo 14) –ya sea directamente en el proceso contráctil, tal como lo sugieren Tirosh y Oplatka, o indirectamente para movilizar las moléculas requeridas hacia su lugar.

Otro sitio en el cual los manojos de filamentos de actina son prominentes es la microvellosidad. La microvellosidad es un manojo firmemente empaquetado de filamentos de actina unidos mediante enlaces cruzados que sobresale hacia fuera de la célula para crear una protrusión. El ejemplo mejor estudiado es el la mucosa en cepillo intestinal, donde microvellosidades agrupadas se proyectan como las cerdas en un cepillo (Fig. 11.16). Cada cerda contiene alrededor de 30 filamentos de actina enlazados cruzadamente vinculados unos con otros por las proteínas fimbrina y vilina. Alrededor de la periferia de cada manojo se encuentra una estructura de proteínas similares a la miosina. Por ende, todos los elementos requeridos para el flujo están en su lugar, aunque, por lo que yo sé, el flujo nunca ha sido sugerido.

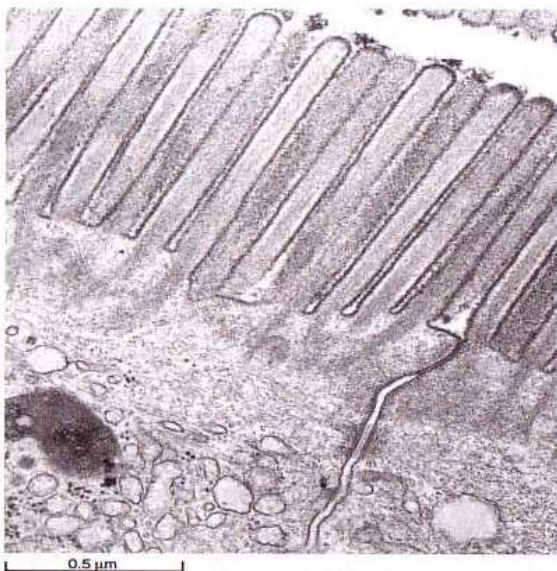
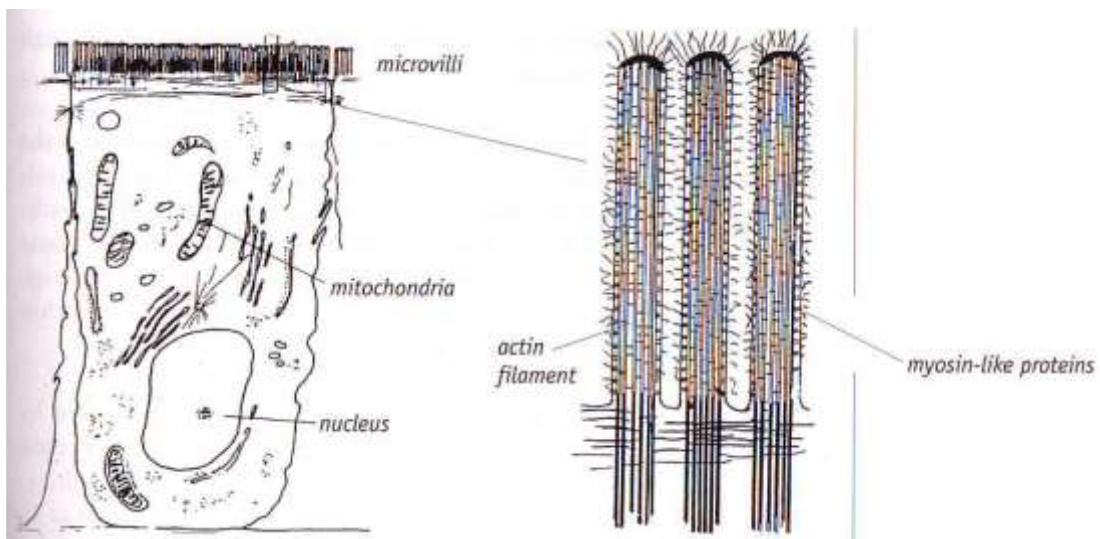


Figura 11.16. Estructura esquemática del borde en cepillo. Según Bray (1992). Micrografía electrónica correspondiente mostrada abajo, cortesía de P. Matsudaira.

La función de la mucosa en cepillo es facilitar el intercambio de nutrientes en el intestino. La visión en consenso es que el borde en cepillo y otras organelas basadas en las microvellosidades operan a través de la creación de un área de superficie extra para facilitar la difusión a través de la frontera celular. Pero esta racionalidad no es enteramente obvia, ya que cualquier ventaja tal sería contrarrestada por la alta densidad del empaquetado de los filamentos como asimismo por la alta viscosidad del agua estructurada dentro de la densa estructura –de las cuales ambas impedirían la difusión.

Una posibilidad del todo diferente es que el intercambio sea facilitado mediante el flujo. A través del flujo activo a lo largo del manojito, las sustancias podrían ser transportadas a través de la frontera celular a ritmos por lejos más intensos que los alcanzables mediante la difusión. La estructura de filamentos de actina existiría entonces no como un rasgo incidental, sino para la ejecución de una tarea particular. Y la presencia de proteínas del tipo de la miosina alrededor de la periferia se tornaría explicable –ya que la miosina es requerida para el flujo en base a actina. Para situaciones como las del intestino, donde el objetivo principal es una alta tasa de transferencia de material, el flujo cobra sentido.

CONCLUSIÓN

Entre los más básicos requerimientos de la célula viviente se halla la necesidad de transportar sustancias desde un lugar hasta otro. Esta necesidad se presenta tanto en el interior de la célula como también a través de la frontera celular. Debido a que el requerimiento de transporte es primitivo, es poco probable que se base en mecanismos de gran complejidad. El mecanismo de transporte propuesto satisface el criterio de simplicidad, en el sentido de que una estructura de filamentos de actina es en gran parte todo lo que se necesita. Aún así, es eficaz. Las sustancias son transportadas vectorialmente, y pueden ser transportadas sustancialmente más rápido que mediante la difusión. El hecho de que los principios subyacentes del sistema hayan sido exitosamente adoptados en aplicaciones de ingeniería le brinda apoyo a su viabilidad.

A pesar de los méritos, el mecanismo en base a actina no es el único mecanismo de transporte empleado por la célula. Para aplicaciones más sofisticadas, la célula ha desarrollado un sistema conmensurablemente más sofisticado, basado en los microtúbulos. Pero no hay mucho de qué preocuparse. La naturaleza no inventa un nuevo principio funcional en cada esquina, por lo cual existen motivos para prever que el principio funcional de este sistema más altamente evolucionado sea similar a el que acabamos de considerar. Es sobre la base de esa premisa que se desarrolla el próximo capítulo.



El Stiletto Rojo, David Crow (fotografía por Harrod Blank)

CAPITULO 12: TRANSPORTE CON ESTILO

Primera entre las limitaciones del sistema de transporte en base a actina se halla la ausencia de selectividad. Las sustancias usuales tales como las proteínas, las organelas, los iones, los aminoácidos y los azúcares, por lo general son transportadas indiscriminadamente (para una excepción, ver Mehta *et al.*, 1999). El transporte a granel tiene sentido cuando el objetivo es mover todo. En otras situaciones el transporte a granel tiene menos sentido. En la neurona, por ejemplo, el objetivo es desplazar un neurotransmisor hasta el sitio de liberación terminal sin alterar necesariamente el equilibrio de los constituyentes citoplasmáticos –de otro modo, el terminal se hincharía como un tobillo esguinzado.

Una segunda limitación general del sistema de actina es la baja eficiencia. Incluso si se debe transportar una única molécula, todos los filamentos paralelos generan conjuntamente la ondulación propagativa. Esto es ineficiente. Sumado a esta ineficiencia está el hecho de que las cargas abultadas no pueden encajar dentro del manojo y deben por ende ser transportadas a lo largo de su periferia.

Dadas estas limitaciones, no es ninguna sorpresa que la naturaleza desarrollase un sistema más selectivo en el cual el transporte está vinculado a un único elemento longitudinal. Este sistema se basa en el microtúbulo, un largo polímero tubular conformado por la proteína tubulina (Fig. 12.1). Los dímeros de tubulina, armados a partir de subunidades alfa y beta, se enlazan unos con otros para formar largos protofilamentos, los cuales a su vez se adosan a protofilamentos paralelos para crear el túbulo. Los microtúbulos contienen ordinariamente 13 filamentos paralelos alrededor de su circunferencia aunque los de 12 y 14 no son infrecuentes.



Figura 12.1. Estructura molecular del microtúbulo. El elemento básico es el dímero de tubulinas, mostrado como esferas acopladas.

A diferencia del sistema de la actina, el sistema más altamente evolucionado de los microtúbulos transporta una carga especificada. Cada pieza del equipaje es agarrada por una proteína accesoria, lo cual luego facilita el transporte a lo largo del microtúbulo como la miosina facilita el transporte a lo largo del conjunto de filamentos de actina. Dado este paralelismo, la posibilidad de un principio de transporte similar parece ser digna de consideración.

MODELOS AMBULANTES

Antes de contemplar seriamente los modelos de transición de fase, examinamos la hipótesis actualmente aceptada sobre el transporte por microtúbulos. Está basada principalmente en experimentos conducidos con la proteína accesoria kinesina, y hasta algún punto en la dineína. La kinesina es una proteína con forma de huso conteniendo tres regiones funcionalmente distintas: un par de cabezas semejantes a miosina; un tallo intermedio; y una cola con forma de abanico (Fig. 12.2). La cola adosa la carga especificada y la cabeza interactúa con el microtúbulo. En gran parte a través de una analogía con la miosina, se cree que las cabezas contienen motores internos. Se piensa que estos motores impulsan a las cabezas (que operan más bien como pies), las cuales se pasean tranquilamente pasándose una a la otra a lo largo del microtúbulo y de esa forma transportan la carga.

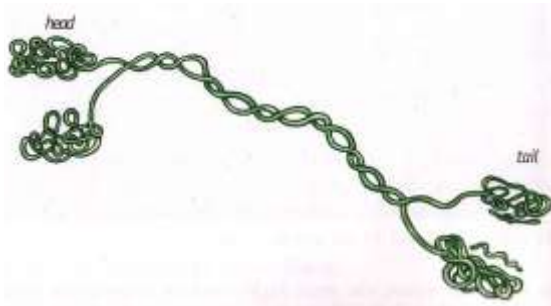


Figura 12.2. Modelo de la molécula de kinesina.

Los estudios de traslación mediante kinesina han revelado dos rasgos mecánicamente relevantes. Primero, los movimientos suceden a lo largo de una línea recta. La kinesina se traslada virtualmente sin desviación a lo largo de uno de los 13 protofilamentos lineales que conforman el microtúbulo (Fig. 12.1). Segundo, la traslación a lo largo de este sendero lineal del protofilamentos ocurre discretamente, un paso a la vez (Fig. 12.3). El tamaño del paso es equivalente al espaciamiento entre tubulinas sucesivas, 8 nm. Ocasionalmente, se observan pasos de dos veces o incluso tres veces 8 nm.

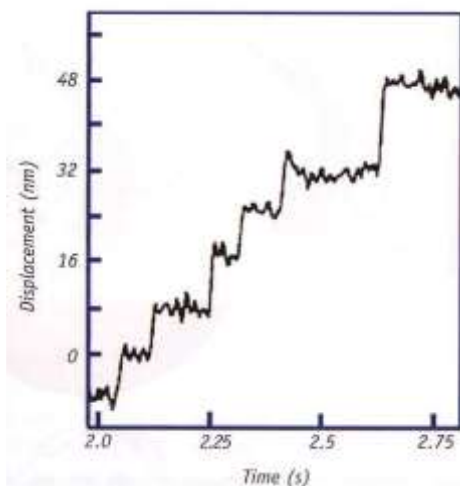


Figura 12.3. Traslación con movimiento desde un punto al próximo adyacente de la kinesina a lo largo de un microtúbulo. De Kojima et al. (1997).

Para explicar estos pasos de 8 nm, la visión prevalente es que las cabezas dan un paso desde una tubulina a la próxima. Imaginemos una cabeza asentada sobre la tubulina n y la otra sobre la tubulina $n-1$. La cabeza trasera luego se balancea pasando a la cabeza delantera, asentándose sobre la $n+1$. Luego la n se balancea hacia la $n+2$ y así sucesivamente. Cada balanceo de 16 nm produce un desplazamiento de 8 nm del centro de la masa. El problema es que la cabeza es de un largo de sólo 7 nm (Kull *et al.*, 1996). El tranco de 16

nm deberá por ende contener algún elemento de salto (Fig. 12.4). El salto plantea la cuestión de la gravedad cero: Una vez que la molécula salta, ¿por qué vuelve tan consistentemente a la superficie del microtúbulo en vez de simplemente difundir alejándose? Y más aún, ¿por qué vuelve con una consistencia del 99% al mismísimo protofilamento (Vale *et al.*, 1996)?

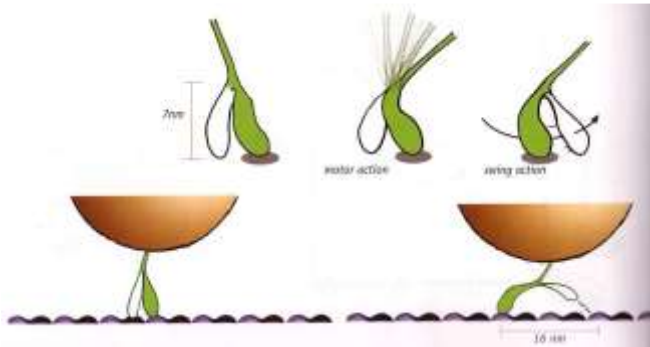


Figura 12.4. Modelo ambulante del transporte por microtúbulo. Arriba: La molécula de kinesina atraviesa una acción motora, lo cual facilita un balanceo de la cabeza. Abajo: El balanceo hacia otra molécula de tubulina, a 16 nm de distancia, requiere un brinco. La carga es mostrada como una esfera.

Este tema del “salto de fe” es aún más serio para aquellas kinesinas tales como la isoforma KIF1A que contiene sólo una cabeza (Hirokawa, 1998). Esta isoforma de única cabeza se mueve a lo largo del microtúbulo en pasos progresivos distintivos (Okada y Hirokawa, 2000). A menos que algún tipo de rasgo mecánico suplementario esté invocado, no resulta obvio cómo un mecanismo de zancada podría operar en moléculas conteniendo solamente una cabeza.

Una segunda e independiente preocupación es si cargas muy pesadas podrían ser movidas por un motor tan diminuto. En el experimento de la translación por kinesina arriba mencionado, un motor de 7 nm necesita reunir suficiente energía como para empujar una microesfera de 1.000 nm. La relación de masa excede a 1:1.000.000, y el trabajo es realizado dentro de los 20 milisegundos. Esta es una formidable tarea –incluso para un conductor que no está obligado a saltar (Fig. 12.5).



Figura 12.5. Perspectiva del tamaño. El motor biológico necesita arrastrar una carga sustancial en un tiempo relativamente corto.

TRANSICIONES DE FASE A LO LARGO DEL MICROTÚBULO

Una manera alternativa de enfocar el transporte del microtúbulo es considerarlo como una versión evolucionada del transporte mediante filamentos de actina. Las similitudes de estructura abundan: los filamentos de microtúbulos y actina son ambos polímeros multi-cadena construidos por elementos globulares pequeños; ambos ligan a numerosos ligandos; ambos pueden conformar ensamblajes paralelos; ambos incorporan nucleótidos enlazados (ATP o GTP); y ambos se polimerizan con una similar dinámica en base a la separación de nucleótidos. Y tal como los filamentos de actina, los microtúbulos pueden formar geles fácilmente (Weisemberg y Cianci, 1984). Por lo tanto, el potencial para la función paralela es digno de ser explorado.

Para producir cualquier cosa parecida a la onda peristáltica que se desplaza a lo largo del filamento de actina, se requieren tres rasgos esenciales: La tubulina deberá atravesar algún tipo de cambio estructural; el cambio deberá propagarse a lo largo del microtúbulo; y el cambio propagativo deberá incluir un cambio concomitante en la estructura del agua.

El cambio estructural de la tubulina está confirmado. Dependiendo de si la kinesina está o no ligada, las reconstrucciones de micrografías electrónicas teñidas muestran llamativas diferencias en la conformación de la tubulina, residiendo la diferencia preponderantemente en la subunidad beta de la tubulina (Hoenger y Milligan, 1977). El que un cambio conformacional semejante pudiera conducir al acortamiento del microtúbulo es sugerido por estudios del axoje. El axoje es una organela de encorvamiento consistente en varios millares de microtúbulos unidos mediante puentes transversales a lo largo de su longitud. Durante la torsión (Fig. 12.6), se observa que el espaciamiento axial de las moléculas de tubulina sobre el borde interno se vuelve más pequeño que el de las de los microtúbulos del borde más externo. Pese a que la repetición axial disminuida no fue detectable en todos los campos de micrografías electrónicas, cuando estaba presente era de una magnitud sustancial (McInstosh, 1973). Por lo tanto, la capacidad para el cambio conformacional y el acortamiento que ocurre en el filamento de actina también está presente en el microtúbulo.

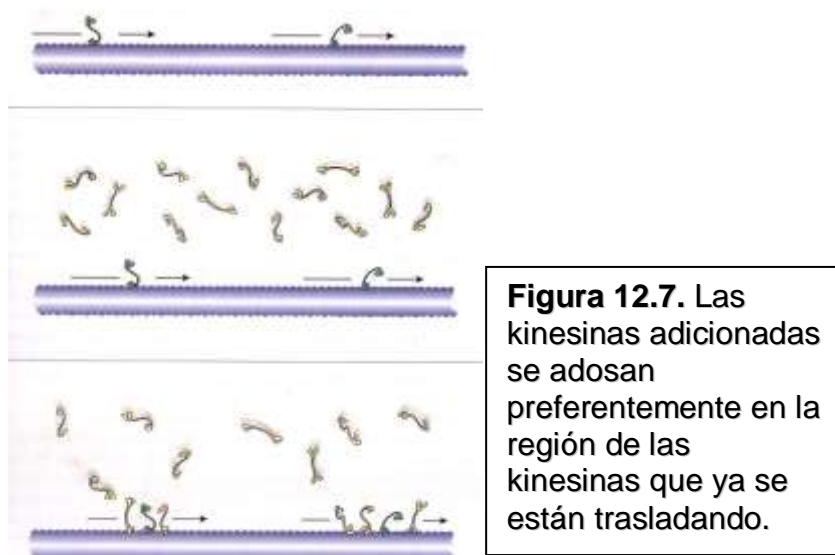


Figura 12.6. A medida que el axoje se dobla, los microtúbulos del borde más interno se acortan.

El segundo requerimiento es que el cambio estructural se propague. En muchas células, los microtúbulos forman senderos radiales desde el núcleo hasta la periferia celular. Se piensa que estos senderos conforman una especie de “sistema nervioso intracelular” para comunicar información en ambas direcciones (Albrecht-Buehler, 1985; Dayhoff *et al.*, 1995). Por ejemplo, las células son a menudo atraídas hacia la luz. Cuando se las expone a una fuente de luz infrarroja, las células de cultivo CV1 responden emitiendo pseudópodos, los cuales les permiten arrastrarse hacia la fuente de luz. El sensor infrarrojo de la célula, el centrosoma, está situado sobre la membrana nuclear, alejado del incipiente pseudópodo. La comunicación entre estos sitios es evidentemente necesaria. Al recibir la célula el estímulo, los microtúbulos que interconectan estos sitios atraviesan un cambio físico-químico (Albrecht-Buehler, 1998). Por lo tanto, alguna información aparentemente se propaga a lo largo del microtúbulo, permitiéndole a la célula reptar en la dirección correcta.

La propagación es usualmente menos obvia en los microtúbulos estudiados en aislamiento, posiblemente porque tales preparados son tratados rutinariamente con la droga Taxol para promover la “estabilización”. Pero no obstante ello, el siguiente resultado experimental implica propagación (Fig. 12.7). A un baño

conteniendo microtúbulos con kinesinas trasladándose, se le sumaron kinesinas adicionales. Las kinesinas agregadas no se establecieron en sitios aleatorios a lo largo del microtúbulo; se adosaron preferentemente en la vecindad de las kinesinas en plena traslación (Muto y Yanagida, 1997). El enlazamiento no se habría localizado con preferencia a menos que las kinesinas en traslación hubiesen inducido algún cambio local que se propagara conjuntamente con las kinesinas en traslación.



La propagación es máximamente obvia cuando los microtúbulos están organizados en estructuras característicamente paralelas conocidas como axonemas. El axonema es la columna vertebral del cilio y el flagelo (ver luego). Estas organelas exhiben una familiar acción de encorvamiento, la cual puede ser vista en el microscopio propagándose desde un extremo hasta el otro al hallarse la organela en funcionamiento. Entonces, existe poco que cuestionar respecto de la propagación a lo largo del axonema; y los estudios de la Figura 12.7 implican que algún cambio estructural también se propaga a lo largo de los microtúbulos constituyentes.

El tercer requerimiento es que la señal en propagación involucre la desestructuración del agua. Para que la desestructuración tome lugar, es evidentemente necesario que comience con el agua estructurada, y esto se halla implicado por la abundante carga superficial negativa de la tubulina. También está implicado por la aptitud de los microtúbulos para gelificar con concentraciones de proteína de menos del 1% (Buxbaum *et al.*, 1987). La alta capacidad para la estructuración del agua también se halla implícita en imágenes de microscopía electrónica, las cuales muestran microtúbulos rodeados por “zonas claras” anulares aparentemente desprovistas de solutos. Tales zonas se hallan documentadas tanto en especímenes de grabado por congelamiento (Stebbins y Willison, 1973) como también en secciones transversales convencionales (Stebbins y Hunt, 1982). Se extienden hasta a ~20 nm desde la superficie del microtúbulo, y persisten incluso cuando un 75% del agua de la célula ha sido removido osmóticamente (Albrecht-Buehler y Bushnell, 1982). Por lo tanto, estas zonas parecen reflejar un agua que se halla firmemente estructurada alrededor de la superficie microtubular.

El que esta agua se desestructure durante la propagación es implicado por los experimentos de adición de kinesina (Fig. 12.7, arriba). Las moléculas de cualquier tipo adicionales experimentarán un acceso limitado al microtúbulo si

el microtúbulo está rodeado por agua estructurada. Un acceso dispuesto cerca de la zona de transición implica localmente una alta solvencia –lo cual a su vez implica una desestructuración local. El escenario es, por ende, comparable a aquel del sistema de actina, abarcando la transición estructural local a ambos la proteína y el agua circundante.

EL ROL DE LA KINESINA

Siguiendo al paralelismo entre microtúbulo y actina, se prevé que el rol de la kinesina será similar al de la miosina –un facilitador. Esto es consistente con la aptitud de la kinesina para inducir una transición de la tubulina (arriba). Por el otro lado, el paralelismo entre kinesina y miosina puede prolongarse sólo hasta ahora; a alguna altura algo deberá diferir porque el sistema microtubular en última instancia diverge del sistema de la actina en sus rasgos distintivos funcionales, especialmente en cuanto a la especificidad de la carga.

Un posible punto de divergencia yace en la forma en que la kinesina facilita, y algún indicio respecto de esto proviene de los experimentos de traslación de la kinesina (Fig. 12.3). Estos experimentos revelan un avance desde un paso hacia el próximo adyacente de 8 nm (a veces de 16 o 24 nm). En medio de estos avances, la kinesina queda pegada sobre el microtúbulo por períodos importantes, durante los cuales el cambio conformacional en la tubulina es presumiblemente inducido. Si el cambio conformacional inducido por la kinesina es requerido para la propagación (y el transporte), y la kinesina enlaza la carga especificada, entonces el transporte de carga estará vinculado directamente a la transición de propagación, tal como es requerido. Los solutos comunes podrían “prenderse” durante el trayecto, pero la energía estará enfocada en el transporte de la carga señalada.

Para imaginar más concretamente cómo podría funcionar un sistema como este, consideren el axón de la neurona. La Figura 12.8 esquematiza la disposición de los microtúbulos. Con un alineamiento limitado y un empaque holgado, la propagación puede ocurrir a lo largo de un microtúbulo sin impactar necesariamente sobre todos los otros. Por el otro lado, la abundante presencia de microtúbulos cercanos establece un mar de agua estructurada rodeando al microtúbulo operativo –un medioambiente que asegura que cualquier zona transitoriamente desestructurada se reestructurará rápidamente.



Figura 12.8. Disposición de los microtúbulos en el axón.

Ahora consideren una transición de fase local a lo largo del microtúbulo, inducida por la vinculación de una kinesina (Fig. 12.9, panel superior). Para conferir una direccionalidad, la carga inducida deberá tener algo de polaridad – por ejemplo, deberá extenderse más lejanamente en una dirección axial que en la otra. Una asimetría de este tipo parece todo menos inevitable, ya que las moléculas de tubulina están ellas mismas polarizadas a lo largo del microtúbulo, con subunidades beta consistentemente yaciendo sobre el mismo lado de las subunidades alfa (Fig. 12.1). Con la transición inducida por kinesina, el agua vecinal se desestructurará. La alta solvencia del agua desestructurada permite que la kinesina adosada se despegue, liberándose a

sí misma de la restricción espacial y preparándose para el movimiento dirigido (panel medio).



Figura 12.9. Mecanismo del avance de la kinesina a lo largo del microtúbulo.

La fuerza impulsora para la traslación proviene en última instancia del frente de avance de la re-estructuración (panel inferior). Este rasgo opera como en el sistema de la actina, excepto que la zona desestructurada no abarca unidades paralelas porque los microtúbulos vecinos están demasiado lejanos; la zona está por ende restringida a la vecindad de la transición. Rodeado por un mar ambiental de estructura, este bolsillo desestructurado será inmediatamente forzado a reestructurarse. Los márgenes se acercan rodeando desde todas las direcciones (flechas), impulsando a codazos a la kinesina liberada a lo largo del microtúbulo, y forzándola a establecerse en algún nuevo sitio –ya sea en la próxima tubulina, o una o incluso dos más allá. El re-adosamiento inicia una nueva transición, lo cual pone en marcha la misma secuencia de eventos en la próxima posición a lo largo del microtúbulo. De esta forma el complejo de carga por kinesina avanza de a un paso por vez.

En un sentido, la molécula de kinesina sí “salta” mientras avanza (Fig. 12.4). Pero el tema de la limitada longitud molecular es debatible porque el salto no es generado por la molécula de kinesina, sino por la transición de fase microtubular. El “motor” yace en el microtúbulo, no en la kinesina. También queda contestado el interrogante del retorno de la kinesina hacia la superficie del microtúbulo: éste es impulsado por la fuerza radial del frente de reestructuración del agua. Y, en cuanto la zona desestructurada esté suficientemente restringida como para descartar una difusión lateral excesiva, la molécula de kinesina liberada debería retornar consistentemente, como fuera observado, al mismo sendero del protofilamento.

MARCHA ATRÁS

Un rasgo intrigante del transporte por microtúbulo es que es una calle de doble mano. La kinesina transporta en una dirección, mientras que la dineína y una molécula semejante a la kinesina llamada *ncd* transportan en la otra. El transporte bidireccional simultáneo a lo largo del mismo microtúbulo es una característica bien reconocida.

La Figura 12.10 muestra que en adición a los senderos lineales, los contactos tubulina-tubulina también definen senderos helicoidales. Tales senderos podrían estar funcionalmente inertes, o, si son activados por la dineína o el *ncd*, podrían apoyar el transporte retrógrado. Cualquier esquema semejante requeriría que el tipo de cambio conformacional inducido por dineína o *ncd* sea diferente al cambio conformacional inducido por kinesina, y esto está confirmado (Hoenger y Milligan, 1997). Por lo tanto, la activación por kinesina podría definir un sendero mientras que la activación por dineína y *ncd* podría definir otros, al menos teóricamente. Los senderos podrían operar con poca interferencia siempre que las zonas de transición fuesen lo suficientemente pequeñas como para que una no interfiera con la otra.



Figura 12.10. Ejemplo de un sendero helicoidal a lo largo del microtúbulo.

El que la propuesta de senderos separados es más que una especulación está demostrado por observación visual directa (Fig. 12.11). Los microtúbulos rotan sobre sus ejes longitudinales a medida que se trasladan sobre una superficie tachonada con dineína (Vale y Toyoshima, 1988; Mimori y Miki-Nonomura, 1995). Una rotación similar se observa en la traslación basada en *ncd*, con una pendiente helicoidal diferente a la de la traslación inducida por dineína (Walker *et al.*, 1990). Por lo tanto, activadores diferentes podrían definir senderos helicoidales para el transporte retrógrado, mientras que la kinesina define un sendero lineal para el transporte anterógrado.

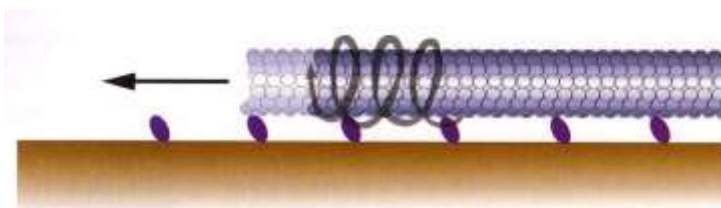


Figura 12.11. Rotación del microtúbulo observada durante la traslación pasando la dineína o el *ncd*.

En suma, existe un apoyo razonable para la propuesta de que los sistemas de transporte basados en microtúbulos y actina funcionan a través de un mecanismo similar. En ambos casos, los fundamentos son explicados por una transición estructural propagativa. El sistema de microtúbulos es más selectivo en cuanto a que la energía se halla enfocada sobre el transporte de una carga diferenciada más que sobre todos los solutos. Y, es más sofisticado en cuanto a que el tráfico bidireccional puede ser apoyado en el mismo microtúbulo y al mismo tiempo. Sin embargo, su operación es apenas más compleja que el más primitivo sistema de actina.

COLECCIONES DE MICROTÚBULOS

Además de tareas de transporte intracelular tales como las consideradas más arriba, también existen requerimientos de transporte fuera de la célula. Los óvulos son propulsados hacia el útero; partículas de polvo inhaladas son expelidas del sistema respiratorio; las células espermáticas son conducidas a través del mucus vaginal; etc. La presencia de tareas de transporte extracelular no necesitan implicar nuevos principios, ya que las máquinas relevantes están construidas con partes estándar –todas se basan en microtúbulos.

Tales sistemas de transporte extracelular se apoyan en gran parte en cilios y flagelos, largas entidades semejantes a una barra cuya unidad estructural principal es el axonema. El axonema es una estructura más bien exótica que contiene un característico agrupamiento de microtúbulos paralelos conocido como $9 + 2$ –dos microtúbulos independientes en el centro y nueve pares distribuidos en círculo, denominándose “doblete” a cada par periférico (Fig. 12.12). Los pares del borde están conectados a los microtúbulos centrales por rayos radiales, elementos robustos que terminan sobre la estructura del hemianillo central denominado vaina interna. Los dobletes están interconectados unos con otros por un fino lazo llamado nexina y, curiosamente, también por una molécula que acabamos de conocer –la dineína.

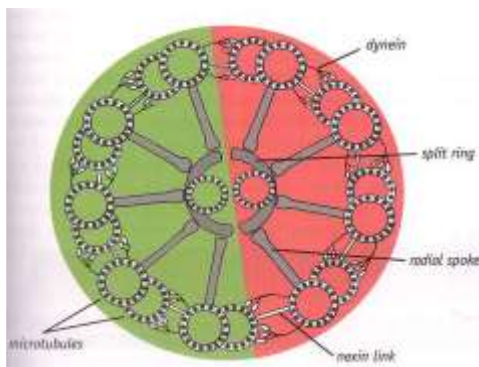


Figura 12.12.
Sección transversal
del axonema cilial
o flagelar.

El axonema desempeña dos funciones aparentemente recíprocas. En los cilios, transporta al fluido pasando la célula, y en los flagelos, transporta la célula pasando el fluido. Estas acciones recíprocas son presumiblemente manifestaciones del mismo principio de funcionamiento –así como las hélices pueden mover el agua, pero también pueden mover un bote a través del agua mediante la utilización del mismo principio de funcionamiento. Para el axonema, la cuestión radica en cuál podría ser el principio.

Puesto que el axonema es esencialmente una colección de microtúbulos, una cuestión es si acaso su principio de funcionamiento podría ser el mismo que el de los microtúbulos. Si el microtúbulo genera transporte, ¿podría el funcionamiento del axonema generar transporte también? ¿Podría el transporte subyacer a la función?

En experimentos que ahora son clásicos, Boodgood y colegas (1977, 1979) infundieron microesferas dentro de un baño conteniendo flagelos de *Chlamydomonas* (Fig. 12.13). Aquellas que se adhirieron fueron prontamente transportadas a lo largo de la superficie flagelar a unos $\sim 2 \mu\text{m}$ por segundo en la dirección axial. Se observó que seguían un rumbo en línea recta, como si estuvieran “operando sobre vías”. El transporte no fue un rasgo de cualquier tipo de marcador particular porque podían transportarse microesferas de

diferentes tamaños y composición, así como también células bacterianas. Tampoco fue un efecto secundario del batido porque flagelos mutantes que no podían doblarse como resultado un defecto focal continuaron siendo capaces de transportar. Un transporte de naturaleza similar también se reportó en cilios, como asimismo en extensiones celulares en forma de aguja llamados axópodos, los cuales también están conformados por conjuntos de microtúbulos unidos mediante enlaces transversales (Troyer, 1975; Bloodgood, 1978).



Figura 12.13. Las microesferas son transportadas a lo largo de la extensión del flabelo activado.

Por lo tanto, el transporte se halla tan evidenciado a lo largo del axonema flagelar y ciliar como lo está a lo largo del microtúbulo aislado. Sin embargo, el rol para el transporte a lo largo del axonema no es inmediatamente obvio, ya que el rasgo prominente del axonema es el plegamiento, no el transporte. Por el otro lado, si el transporte y el plegamiento surgieron igualmente a partir de algún principio mecánico común, entonces esta preocupación debería desvanecerse –y también podríamos ser capaces de comprender cómo hace su trabajo el axonema.

FUNDAMENTOS DEL PLEGAMIENTO AXONÉMICO

De los mecanismos concebibles para crear un acodamiento, las opciones más naturales son el deslizamiento corredizo y el acortamiento. El deslizamiento corredizo de un doblete de microtúbulos pasando su vecino es el modelo de acodamiento aceptado y será tratado escuetamente. El acortamiento de los microtúbulos es otra opción. En barras bimetálicas, por ejemplo, el acortamiento mayor que la otra de una de las dos tiras metálicas lateralmente vinculadas (debido a coeficientes de temperatura diferentes) genera un doblez. En el gel que reptaba como una oruga (Fig. 8.9), una transición estructural que acorta elementos a lo largo de un borde en relación al otro crea un rizo. Similarmente en el axoje, un plegamiento puede surgir al acortarse los microtúbulos a lo largo de un borde en relación a aquellos en el otro borde (Fig. 12.6, arriba). El acortamiento diferencial es una forma natural de crear un doblez.

Una opción a considerar para el axonema, entonces, es un doblez que surge del acortamiento de algunos dobletes de microtúbulos en relación a otros. Al propagarse axialmente este evento, el doblez se propaga de igual forma. Si el vehículo subyacente es una transición de fase microtubular, entonces el transporte será un inevitable producto derivado. El requerimiento de generación de flujo estará satisfecho.

Al considerar si cualquier mecanismo de doblez semejante podría estar fundamentado en la realidad, resulta útil la comprobación de compatibilidad con la estructura, y varios rasgos estructurales parecen relevantes. El primero es el hemi anillo. Éste bisecta el centro del axonema como una banana rebanada por su largo –en efecto creando dos medios axonemas que corren axialmente (Fig. 12.12, arriba). Una transición de fase en un medio axonema pero no en el otro podría generar el doblez (Fig. 12.14). El hecho de que se haya constatado que

el doblez sea consistentemente perpendicular al plano de bisección, incluso al girar levemente a lo largo del axonema, conduce a apoyar esta posibilidad.

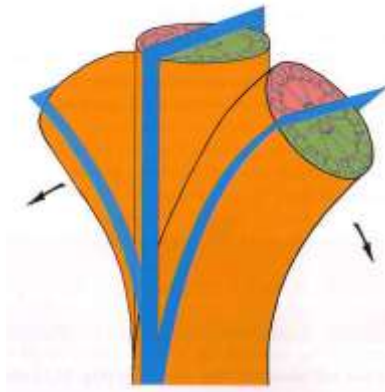


Figura 12.14. El plegamiento axonémico se produce normal al plano de bisección del hemi anillo.

Un segundo rasgo estructural compatible es la distribución de la dineína. A diferencia del microtúbulo aislado donde las dineínas se amontonan a lo largo desordenadamente para facilitar la propagación, las dineínas axonémicas se hallan espacialmente fijadas (Fig. 12.12). El patrón de sección cruzada se repite a intervalos axiales de 24 nm –con la suficiente frecuencia, quizás, como para asegurar una propagación ininterrumpida. Las dineínas en cada intervalo axial aparecen en racimos de 4 -5 cabezas (Fig. 12.15). El agrupamiento implica transiciones simultáneas en múltiples protofilamentos en el mismo nivel axial, un rasgo que podría ser necesario para el disparo del acortamiento localizado. Por lo tanto, las dineínas parecen estar yuxtapuestas para asegurar que el plegamiento y la propagación procedan eficazmente.

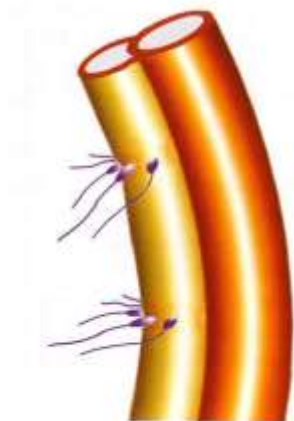


Figura 12.15. Las regiones de transición se acortan cuando interactúan las dineínas, creando plegamientos locales.

Un tercer rasgo estructural digno de mención es la peculiar configuración en dobletes de los microtúbulos del ribete. Esta idiosincrasia puede tener sentido aquí. Las cabezas de dineína se ligan solamente al microtúbulo incompleto del doblete, dejando al compañero completo funcionalmente inerte (Fig. 12.12, arriba). El microtúbulo inerte podría entonces servir como una rígida columna para facilitar una sencilla reversión del doblez. Sin semejante columna, el doblez sería brusco en vez de suave, y el retorno a la rectitud sería mecánicamente menos simple.

Tal parece entonces, que todos estos tres rasgos estructurales encajan naturalmente dentro del marco del mecanismo propuesto. El exotismo estructural sirve a diferentes propósitos.

El mecanismo de curvatura propuesto difiere cualitativamente de las visiones de los libros de texto. La sabiduría actual insiste en que motores en base a dineína impulsan un doblete del ribete al lado del doblete vecino. Se presume que esto induce el encorvamiento –aunque la propagación del doblez es un tanto menos obvia. La evidencia respecto del deslizamiento corredizo proviene en gran parte de observaciones clásicas de axonemas tratados con tripsina: desprovistos de ligaduras transversales, los microtúbulos aflojados “telescopan” pasando uno sobre el otro en presencia de ATP, extendiendo el axonema a hasta nueve veces su longitud inicial (Fig. 12.16). Para muchos, esto es tomado como evidencia convincente respecto de un mecanismo de deslizamiento corredizo.



Figura 12.16. Cuando sufren disrupción por tripsina, los microtúbulos del axonema se pliegan (como un catalejo), tal como se muestra. De Warner y Mitchell (1981).

El modelo propuesto también anticipa el plegamiento tipo telescopio. Cuando los dobletes son desconectados entre sí, las cabezas de dineína pueden trasladarse activamente a lo largo del microtúbulo mediante el mecanismo de transición de fase de propagación arriba descrito. Dado que las cabezas en traslado se originan en un doblete vecino, ese doblete deberá trasladarse conjuntamente con las cabezas. Por lo tanto, el axonema “telescopia” (Fig. 12.17, izquierda). Cuando los microtúbulos no están aflojados, esta misma acción producirá el doblez (Fig. 12.17, derecha). El encorvamiento también podrá estar acompañado por algo de giro si la pauta de corte cruzado de dineína se repite a lo largo de una suave hélice. Por ende, aunque el plegamiento en telescopio es pronosticado mediante un mecanismo de deslizamiento, no está en desacuerdo con el mecanismo de transición de fase de propagación.

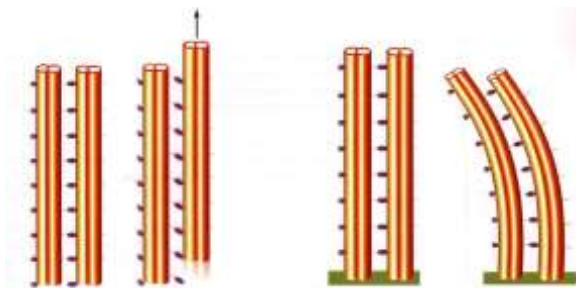


Figura 12.17. Izquierda: Los microtúbulos aflojados “telescopan” como resultado del transporte de dineína a lo largo del microtúbulo. Derecha: El mismo mecanismo resulta en el plegamiento del axonema intacto.

FUNCIÓN CILIAR Y FLAGELAR

¿Cómo podría la transición de fase propagativa traducirse en trabajo útil? Clásicamente, se presume que el rasgo significativo es la acción de doblado. En los cilios, se piensa que el movimiento por curvatura impulsa el fluido a lo

largo de la superficie de la cual emanan los cilios. En el flagelo, se supone que una ondulación propagada empuja sobre el fluido circundante, impulsando de ese modo a la célula adosada. Estas explicaciones parecen intuitivamente razonables. Por otro lado, uno necesita tomar en cuenta el hecho de que además del doblado, estas organelas también generan flujo (Fig. 12.13). Dado que el flujo es generado y el flujo es el producto, parece prudente preguntarnos si un flujo podría estar conectado con el otro. El flujo podría ser un producto derivado irrelevante de la acción axonémica; o podría contribuir a –o incluso crear- un flujo funcional.

Supongamos primero que el flujo generado es irrelevante, y que el flujo funcional es creado exclusivamente mediante el movimiento ciliar. Entonces, varios rasgos de diseño parecen curiosos. A fin de conseguir un máximo empuje para el corcoveo, los implementos de empuje tales como remos y aletas tienen típicamente forma de paleta –pero la sección transversa ciliar es distintivamente redonda. También es curiosa la dinámica de remado. Las poblaciones ciliares exhiben un movimiento con una progresión en onda comparable a la de un campo de trigo agitado por un viento suave. La efectividad de cualquier dinámica tan “metacrónica” para desplazar un lecho de fluido es confusa –llevar remando un bote de remos hacia la victoria, por ejemplo, involucra un remado sincrónico, y no una remada en una progresión tipo onda. También surgen planteos de diseño en los flagelos. Los cálculos basados en la acción de doblado tipo tornillo muestra que 99% de la energía es utilizada para empujar las moléculas de agua lateralmente; sólo un 1% de la energía resta para la propulsión útil del movimiento de avance (Purcell, 1977).

La opción alternativa es que el flujo axonémicamente generado si juegue un rol en la creación del flujo funcional. En los cilios, el flujo axonémico haría el trabajo directamente. En los flagelos, la célula adosada sería impulsada por la fuerza reactiva del flujo generado, de forma similar a como el calamar, o el bote, se impulsan a sí mismos.

Estas propuestas podrían parecer perversamente radicales, pero son secuelas lógicas del flujo experimentalmente observado a lo largo del axonema. La cuestión principal es si semejante flujo podría ser cuantitativamente adecuado, y los experimentos de traslación superficial de microesferas citados arriba implican que podría ser. Estos experimentos fueron conducidos de dos maneras: marcadores trasladándose a lo largo del axonema espacialmente fijado; y axonema trasladándose sobre marcadores espacialmente fijados. La velocidad de traslación fue la misma. El hecho de que el axonema pudiera trasladarse a la misma velocidad incluso con su abultado cuerpo celular adosado muestra que la capacidad de fuerza impulsora debe ser considerable.

Para ilustrar como este mecanismo podría operar en una situación real, consideren la acción propulsora en el alga verde unicelular común *Chlamydomona*. La *Chlamydomona* tiene dos flagelos parecidos a antenas que impulsan la célula a través del agua. La célula ordinariamente nada hacia delante, las antenas al frente; pero durante una reacción de evitación puede nadar hacia atrás. Las diferencias en las respectivas orientaciones flagelares son contundentes (Fig. 12.18). Durante la natación hacia delante (secuencia superior), los flagelos sufren una especie de brazada estilo “pecho”. Hacia el momento en que la onda propagada corre hasta cualquier lugar cerca de la punta del axonema, la sección distal del axonema está apuntando hacia atrás, de modo que el flujo saliente puede impulsar la célula hacia delante. Cuando

está nadando hacia atrás (abajo), los flagelos quedan dirigidos hacia adelante –impulsando la célula hacia atrás. Dependiendo de la dirección de nado deseada, entonces, el encorvamiento puede conferir la orientación requerida para el flujo del fluido apropiadamente dirigido.

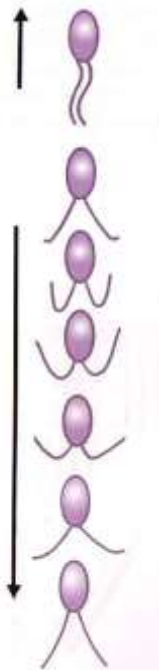


Figura 12.18. En las *Chlamidomonas*, las puntas flagelares apuntan fundamentalmente hacia la dirección opuesta al movimiento. Según Bray (1992).

La operatividad de los cilios seguiría a lo largo de lineamientos similares. Los cilios son estructuras típicamente más cortas que los flagelos, diseñados para impulsar fluido en una dirección perpendicular a su orientación normal. Para generar el flujo en la dirección requerida, la sección distal del cilio necesitaría reorientarse. Y eso es en realidad lo que logra el movimiento de doblado. Las secciones distales pasan la mayor parte de su tiempo orientadas paralelamente a la superficie celular (Fig. 12.19). De este modo, el flujo generado es dirigido apropiadamente.

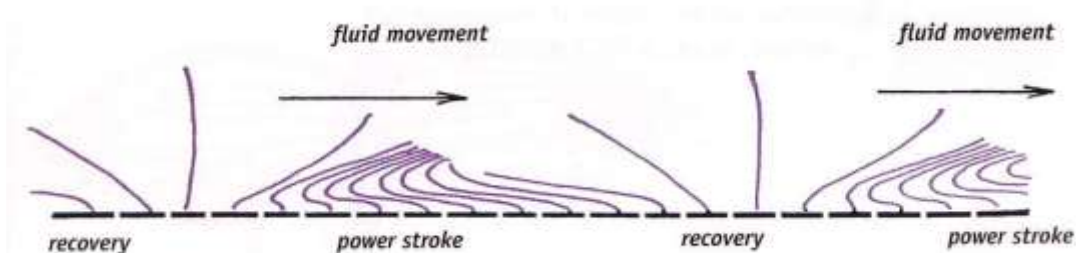


Figura 12.19. Línea temporal de la brazada por plegamiento ciliar (de izquierda a derecha). La sección distal permanece gran parte del tiempo en la dirección paralela a la superficie, particularmente durante la “brazada de potencia”. Según Bray (1992).

Para que un mecanismo basado en el flujo de este tipo sea efectivo, muchos cilios necesitarían operar colectivamente; la acción de uno sólo no podría transportar un lecho de fluido. Por el otro lado, la acción sincrónica no funcionaría bien porque el fluido arrastrado simultáneamente desde la base de cada cilio dejaría un vacío, el cual impediría el proceso. Resulta más natural un escenario en el cual el fluido transportado es pasado a lo largo progresivamente desde un elemento hasta el próximo. Por ende, la progresión metacrónica observada tiene sentido dentro del marco propuesto.

CONCLUSIÓN

Tal como el motor diesel, el motor del microtúbulo puede generar maravillosos resultados con pocas partes móviles. En principio, los elementos estructurales necesarios son los microtúbulos, proteínas accesorias necesarias para disparar la transición de fase microtubular, y un combustible como el ATP. Este simple sistema puede transportar ambos solutos y fluido. Puede llevar a cabo esta tarea dentro de los confines de la célula –o afuera de la célula cuando está abarcado dentro de un marco estructural tal como el axonema.

Un punto a enfatizar es la temática consistencia entre los mecanismos propuestos de transporte por microtúbulos y por actina. Ambos involucran una transición de fase propagada. El sistema de microtúbulos es una versión evolucionada del sistema de actina, proporcionando una eficiencia y una versatilidad más altas. Colectivamente, estos sistemas ofrecen un espectro de opciones para las diversas tareas de transporte intracelular y extracelular de la célula.

Entre las más consecuentes de tales tareas de transporte se halla la que consideramos en el próximo capítulo –el transporte de cromosomas. El transporte de cromosomas sucede durante la división celular, cuando los sistemas en base a microtúbulos y los basados en actina se reúnen en un escenario orquestado para repartir los cromosomas dentro de las incipientes células hijas y dividir el citoplasma en dos. La trama que se desenvuelve es espesa y fascinante. Y está repleta de actores familiares que llevan consigo abundantes pistas mecanicistas.

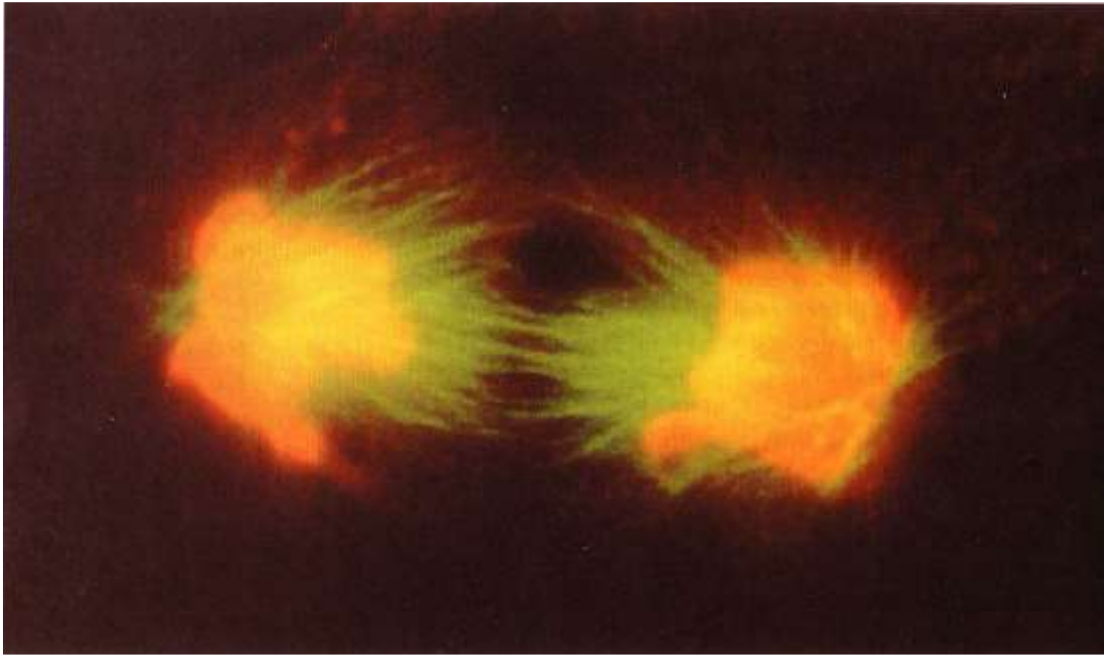


Imagen de inmunofluorescencia de la mitosis de una célula mamífera, cortesía del Dr. J. R. McIntosh

CAPITULO 13: DIVISIÓN CELULAR

La división celular es un proceso conocido manejado por actores conocidos (Fig. 13.1). Los microtúbulos enmarcan el evento primario. Crean el huso mitótico, un andamio en cuyo interior los cromosomas pueden ser hábilmente segregados en dos incipientes células hijas. La célula recurre luego a la actina para el paso subsiguiente –la citocinesis. Un gel de filamentos de actina de forma semejante a un anillo se forma alrededor del ecuador del huso, y divide el citoplasma a través de contraerse como un esfínter. Una célula se convierte en dos.

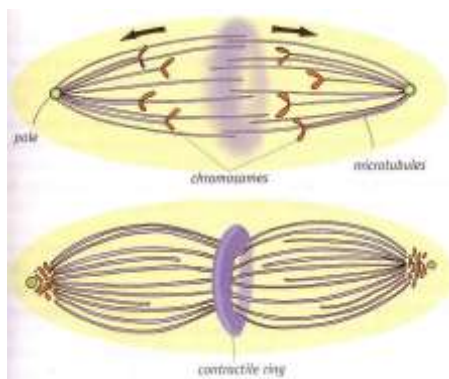


Figura 13.1. El proceso de división celular consiste en la mitosis (arriba) y la citocinesis (abajo).

A pesar de que las dinámicas de la mitosis y la citocinesis son conocidas hasta en sus más ínfimos detalles, los mecanismos subyacentes permanecen confusos. Los actores principales, sin embargo, son los mismos que aquellos de los dos últimos capítulos y el objetivo es determinar el grado al cual los mecanismos de esos capítulos podrían ser suficientes. ¿Podría el transporte cromosómico operar mediante el mismo principio que el del transporte de organelas y solutos?

Para mantener racionalizada la presentación me enfoco sólo en los eventos principales, y de ese modo evito andar penosamente a través de la maraña terminológica de los estadios mitóticos (profase, prometafase, etc.), lo cual implícitamente enfatiza la morfología. Aquí, el foco es sobre los mecanismos. Para aquellos interesados en detalles adicionales yo recomiendo el excelente libro de texto de Bray (1992), así como también las revisiones orientadas de Inoue y Salmon (1995), Hyman y Karsenti (1996), y Nicklas (1997).

EL ELENCO

Además del huso y del anillo contráctil (Fig. 13.1), cuatro personajes juegan destacados roles en el drama de la división celular:

(i) *El cromosoma* (Fig. 13.2). Esta estructura contiene la información genética por duplicado, un juego en cada una de sus dos cromátidas hermanas. Las cromátidas hermanas se hallan unidas en su cintura por una constricción tipo cinturón, y eventualmente se separarán y migrarán en direcciones opuestas hacia las dos células hijas incipientes.

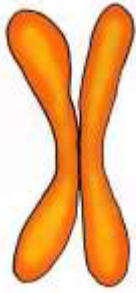


Figura 13.2. El cromosoma consiste un par de cromátidas hermanas adosadas en su cintura.

(ii) *El cinetocoro (Fig. 13.3).* Los cinetocoros son estructuras especializadas opuestamente orientadas a ambos lados del centrómero del cromosoma. La morfología del cinetocoro es curiosa. Proyecciones tipo cerdas de cepillo cercanamente espaciadas emanan desde una base trilaminar densamente empaquetada, creando una estructura suficientemente distintiva como para sugerir un rol especial.

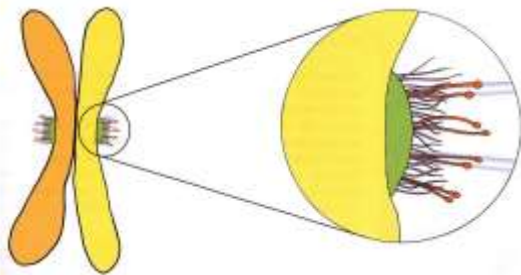


Figura 13.3. Los cinetocoros se sitúan a cualquiera de ambos lados del par de cromátidas hermanas (izquierda). La imagen ampliada (derecha) muestra proyecciones semejantes a cerdas de cepillo y proteínas activadoras que interactúan con los microtúbulos.

(iii) *Proteínas activadoras de los microtúbulos.* Pegados al cinetocoro, estas proteínas se proyectan más allá de las proyecciones tipo cerda (Fig. 13.3). Incluyen a la dineína, así como también a las proteínas tipo kinesina MCAK y CENP-E (Yen *et al.*, 1992; Wordeman y Mitchison, 1995; Walczak *et al.*, 1996). Generalmente se presume que estas proteínas facilitan el transporte a lo largo de los microtúbulos del huso.

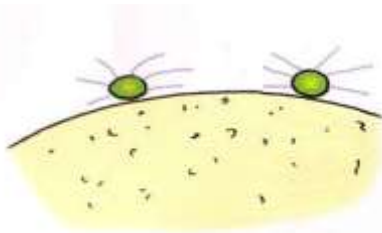


Figura 13.4. Los centrosomas situados sobre la membrana nuclear de las células eventualmente desarrollarán el huso.

(iv) *Centrosomas (Fig. 13.4).* Los centrosomas se convertirán en los polos mitóticos –los sitios de agrupamiento desde los cuales crecerán eventualmente los brotes microtubulares para formar el huso.

Con este elenco, la obra teatral procede. La obra está dominada por un tema que recurre una y otra vez en la división celular y también en otros procesos celulares: la polimerización. La polimerización ha sido considerada brevemente en el contexto de la ameba, donde el crecimiento de filamentos de actina era fundamental para la extensión de pseudópodos (Capítulo 11). La polimerización es fundamental para la mitosis, y por eso aquí tratamos el tema con más detalle.

POLIMERIZACIÓN

Para poder polimerizar, los monómeros deben asociarse. Los factores que promueven la asociación promoverán por tanto la polimerización, y uno de los más omnipresentes de estos es el medioambiente. Los medioambientes dominados por agua estructurada excluyen a los solutos, los cuales deben entonces ser forzados hacia superficies vecinas, donde la asociación puede ocurrir. Si la asociación ocurre en el extremo de un filamento, el filamento polimerizará, o se alargará. En ambientes no estructurados, en contraste, cualquier tipo de presión para polimerizar será reducida considerablemente porque los solutos son más solubles y menos excluidos. Por ende, cuanto más alta la estructuración del agua, más alta la proclividad hacia la polimerización.

Los mismos principios deberían aplicarse no sólo para el equilibrio polimerización-despolimerización, sino también más generalmente para cualquier tipo de asociación o ligadura. Los ambientes estructurados promueven la ligadura, mientras que los medioambientes no estructurados promueven el des-enlazamiento. Una transición hacia la estructura podría, por ejemplo, promover la asociación de una enzima con su sustrato; si la desestructuración fuese un producto derivado de la acción enzimática, la enzima se disociaría subsecuentemente, completando de esta forma el ciclo enzimático.

Con este telón de fondo, consideren el proceso del crecimiento del microtúbulo, lo cual es requerido para la construcción del huso. Recuerden el capítulo previo. Visualicen un bolsillo de agua no estructurada corriendo a lo largo del microtúbulo (Fig. 13.5). Al moverse el bolsillo hacia el extremo del microtúbulo y colapsar hacia el mar de estructura circundante, los solutos contenidos serán forzados hacia el microtúbulo. Si estos solutos incluyen a la tubulina, la cual puede ligarse al extremo del microtúbulo, el microtúbulo podría crecer. Inversamente, el microtúbulo podría despolimerizarse si el bolsillo de algún modo pudiese persistir.

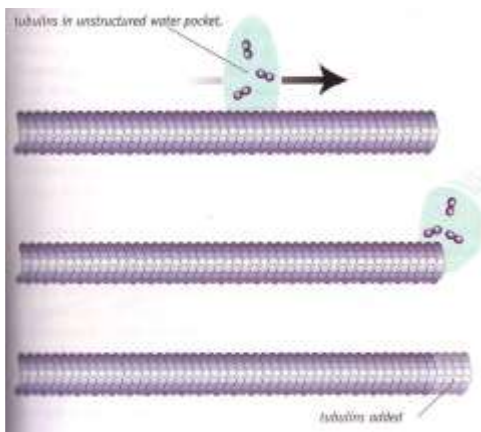


Figura 13.5. Las tubulinas contenidas dentro de un bolsillo móvil de agua no estructurada pueden alargar el microtúbulo al colapsar el bolsillo en el extremo positivo del túbulo.

¿Cómo podría un principio semejante ser utilizado en la construcción del huso?

CRECIMIENTO DEL HUSO

El proceso de la construcción del huso comienza con dos trastornos iniciados por el programa del ciclo celular. En el núcleo, hebras dispersas de cromatina se condensan en pares de cromátidas hermanas. En el citoplasma, la red citoesquelética se disuelve: A través de una transición gel-sol que desestructura el agua, microtúbulos, filamentos de actina y otros elementos esqueléticos (excepto los filamentos intermedios) sufren una completa

despolimerización y se dispersa por todo el citoplasma. Estos actores transformados quedan a la espera de su llamado a escena.

El primer llamado es para la construcción del huso. La construcción empieza en los brotes microtubulares (Fig. 13.4), los cuales eventualmente evolucionarán hacia el huso. Los brotes crecen al ligarse y polimerizar las tubulinas disueltas. El crecimiento permanecerá lento, no obstante, porque la difusión aleatoria es un proceso no dirigido y existe poca presión para polimerizar.

Para efectuarse la polimerización con una velocidad razonable, la célula requiere un sistema más dirigido. Semejante sistema yace en suspenso, porque entre las moléculas disueltas en el citoplasma está la proteína activadora del transporte, la kinesina. La acción de la kinesina puede inducir activamente el transporte dirigido a lo largo de los microtúbulos (Capítulo 12), y los microtúbulos retoñando desde la región polar (centrosómica) no deberían ser la excepción. El flujo inducido arrastrará solutos desde el citoplasma (Fig. 13.6). Las moléculas de tubulina arrastradas pueden realzar el crecimiento del microtúbulo. La retroalimentación positiva impulsa el rápido crecimiento microtubular. La dirección de crecimiento será principalmente paralela a la membrana nuclear porque la dirección perpendicular, hacia el citoplasma abierto, es menos conducente al crecimiento: el citoplasma es un sol cuyo carácter no estructurado no apoya fácilmente la polimerización. Por lo tanto, el huso crece, y madura hacia su forma característica.

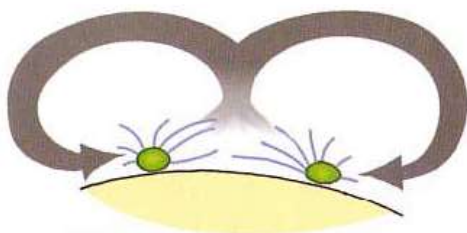


Figura 13.6. El flujo direccional lleva las tubulinas solubilizadas hacia los centrosomas, lo cual realza la polimerización de los microtúbulos.

El elemento central de este mecanismo es el flujo, y el interrogante lógico es si existe alguna evidencia de que el flujo se origine en la región polar.

Desde la década de 1930 ha quedado claro que las partículas insertadas dentro de la región polar son eyectadas. El origen de la así denominada fuerza de eyección polar ha quedado en el misterio, y debido a su naturaleza difusa ha sido bautizado como el “viento polar”. Las partículas confirmadas de ser sopladas por este viento incluyen a fragmentos de brazo cromosómico, partículas membranosas pequeñas, y nucleolos. Estas partículas fluyen desde el polo hacia el plano ecuatorial del huso o la periferia. La fuerza no surge como alguna especie de **juego de pulseada con soga** entre las mitades de huso complementarias porque puede observarse en mitades de huso en aislamiento –las partículas se alejan del polo y paran de moverse al salir del ensamble de microtúbulos. La magnitud de la fuerza de eyección depende de la densidad local de microtúbulos y del área de superficie de las partículas normalmente proyectadas hacia el eje del microtúbulos (para una revisión, ver Rieder y Salmon, 1994).

Toda esta evidencia es consistente con una fuerza de eyección basada en el flujo –difícilmente una sorpresa, dado que el flujo es generado por los microtúbulos constituyentes tanto como por los ensambles de microtúbulos

(Capítulo 12). La corriente de flujo acarrea partículas sin tener en cuenta su naturaleza, y las eyecta del ensamble de microtúbulos. La dependencia de la fuerza de eyección del área de superficie de la partícula es previsible: partículas más grandes son empujadas por una cantidad mayor de moléculas de agua fluyentes. De hecho, la fuerza de flujo total puede ser lo suficientemente fuerte como para impulsar al mismísimo polo: Cuando drogas tales como el nocodazole o la colcemida son aplicadas para disolver aquellos microtúbulos inmediatamente adyacentes al polo, el huso residual genera una fuerza suficientemente grande como para aspirar la totalidad del montaje del polo (Ault *et al.*, 1991). Por lo tanto, los microtúbulos del huso parecen generar magnitudes sustanciales de flujo.

Una consecuencia de la generación de flujo deberá ser una fuerza reactiva. Del mismo modo que una canoa es propulsada en la dirección opuesta al golpe del remo, los medios-husos se moverán opuestamente al flujo (Fig. 13.7). Es una simple cuestión de acción y reacción. Con poca resistencia, los dos montajes de microtúbulos complementarios se separan. Por lo tanto, la separación de polos –un elemento esencial de la mitosis- es llevada a cabo como un producto derivado de la construcción del huso.

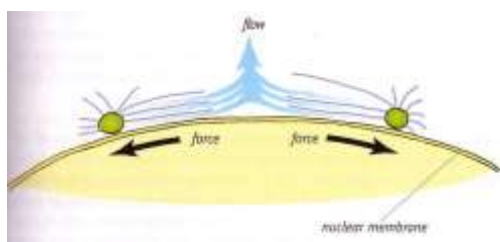


Figura 13.7. La generación del flujo produce una fuerza direccionada hacia un polo.

La construcción procede también en la dirección lateral. Una vez que el programa del ciclo celular dispara la disolución de la membrana nuclear, el crecimiento del huso puede proceder lateralmente. Los microtúbulos invaden la antigua región nuclear y progresivamente envuelven los cromosomas suspendidos. Una vez envueltos, los cromosomas deberían seguir la corriente de flujo del mismo modo que las tubulinas y las kinesinas, dirigiéndose hacia el centro del huso. Por lo tanto, la corriente de flujo explica de un modo sencillo cómo migran los cromosomas hacia el ecuador, donde necesitan estar. En el ecuador, los cromosomas quedan atrapados entre dos corrientes opuestamente dirigidas, machacadas incesantemente por empujones desde ambas y de este modo sufriendo la característica agitación de un lado al otro comúnmente conocida como la “danza de la prometafase”.

Mientras tanto, la polimerización microtubular continúa como un resultado de este flujo. Pero hay un problema –el ecuador está ahora repleto de cromosomas, los cuales obstruyen el paso de los microtúbulos en crecimiento. Los cromosomas, sin embargo, son obstrutores más que pasivos: Como polímeros condensados, crean microambientes estructurados. Debido a que la estructura promueve la polimerización (arriba), el crecimiento de los microtúbulos estará dirigido hacia los cromosomas. Semejante potencial de arrastre debería ser especialmente fuerte en la región del cinetocoro debido a la firme estructuración anticipable desde las proyecciones tipo cepillo densamente empaquetadas. Por lo tanto, los microtúbulos en crecimiento deberían –y lo hacen- condensar preferentemente hacia los cinetocoros (Fig. 13.8).

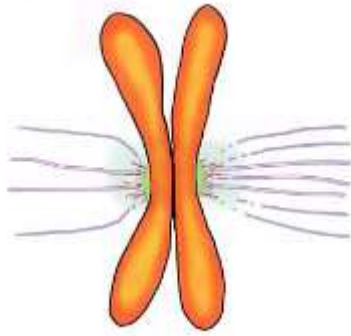


Figura 13.8. Los microtúbulos en crecimiento son arrastrados hacia los cinetocoros debido a su medioambiente altamente estructurado.

La asociación cinetocoro-microtúbulo conlleva varias consecuencias. La más conspicua es la restricción de los cromosomas, cuya actividad de danza agotadora se atenúa progresivamente hasta la quietud con el incremento de la asociación. La asociación también vincula a los dos medios-husos. Esta ligadura detiene el proceso de separación de los polos –al menos por el momento. Finalmente, los microtúbulos que sobrepasan a los cromosomas y escapan a las garras del cinetocoro pueden continuar creciendo sin dificultad y, eventualmente, solapar a aquellos microtúbulos que crecen desde el medio-huso opuesto (Fig. 13.9). Los microtúbulos solapados están listos para mediar una ulterior separación de los polos.

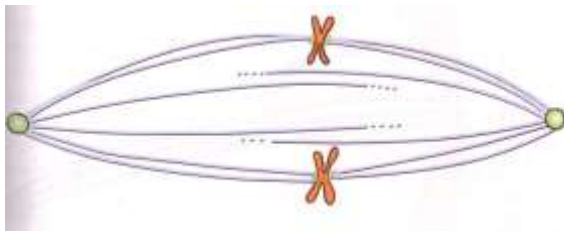


Figura 13.9. Una vez que los cromosomas vinculan a los dos medios husos, sólo aquellos microtúbulos que escapan a las garras de los cromosomas pueden continuar creciendo.

TRANSPORTE HACIA LOS POLOS

Todas las acciones hasta ahora establecen el escenario para el evento principal: la separación de cromátidas. La separación permite que una copia del material genético migre hacia cada una de las dos incipientes células hijas. Este proceso comienza cuando la vinculación entre cromátidas hermanas se rompe, permitiendo a cada cromátida empezar su viaje en dirección al polo.

En principio, el transporte de la cromátida podría seguir a lo largo de las líneas perfiladas en el capítulo previo. Las proteínas activadoras de microtúbulos en el cinetocoro podrían facilitar el transporte hacia el polo –pero existe un curioso problema. La vía hacia el polo (en mamíferos) consta de no uno sino alrededor de 40-60 microtúbulos densamente empaquetados. ¿Cómo podría la abultada carga cromosómica abrirse camino a través de un matorral tan espeso? ¿Y por qué habría de existir, en todo caso, más de un microtúbulo por cromosoma?

El problema se resuelve a través del recurso de la despolimerización: la cromátida “come” su camino a través del matorral (Fig.13.10). Este reconocido fenómeno tipo “Pacman” explica cómo la cromátida puede penetrar a través de este obstáculo espacial –ganando en fuerza y seguridad el proceso de transporte a través de la presencia de múltiples microtúbulos. También le impone una especie de llave inglesa a nuestro desarrollo porque implica ya sea que el mecanismo de transición de fase después de todo no es la respuesta a todos los procesos de movimiento, o que la despolimerización puede ser un rasgo implícito de las transiciones de fase, apareciendo cuando las circunstancias son apropiadas.

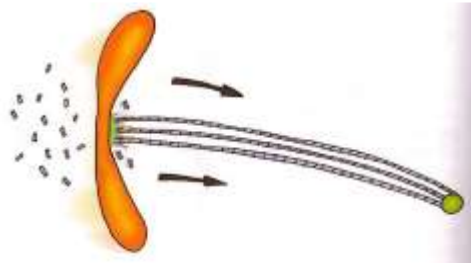


Figura 13.10. Al moverse la cromátida a lo largo de los microtúbulos, el conjunto se despolimeriza.

Para analizar esto último, dirigimos la mirada hacia el exclusivo elemento del sistema de transporte, el cinetocoro. El cinetocoro contiene las proteínas activadoras de microtúbulos. Estas proteínas son curiosas en cuanto que contienen largos tallos, típicamente > 100 nm, los cuales presumiblemente se hallan completamente extendidos en el medioambiente estructurado del cinetocoro (Capítulo 8). Las cabezas de estas proteínas se proyectarán de este modo bastante más allá del denso cepillo coronal (Fig. 13.3). Esta disposición implica alguna función especial.

Una posibilidad es que esta disposición idiosincrática provea un vehículo para acoplar el transporte con la despolimerización, y un esquema altamente tentativo es presentado en la Figura 13.11. La condición inicial es mostrada en el panel *i*. En el panel *ii*, una transición de fase del microtúbulo crea una desestructuración local, lo cual predispone a los monómeros a disolverse y al tallo a plegarse. El plegamiento del tallo traslada anterógradamente el complejo cromosoma-cinetocoro, hacia el polo. El sistema se recupera ya que las fibras coronales firmemente empaquetadas nuclean la reestructuración (panel *iii*). Mientras la cromátida es mantenida en su lugar por la asociación entre microtúbulo y fibra coronal, el frente de reestructuración endereza el tallo y avanza las cabezas hasta la próxima posición a lo largo del microtúbulo. Una vez que las cabezas se re-ligan en la posición adelantada, el sistema está preparado para el próximo paso de traslación rumbo al polo (panel *i*).

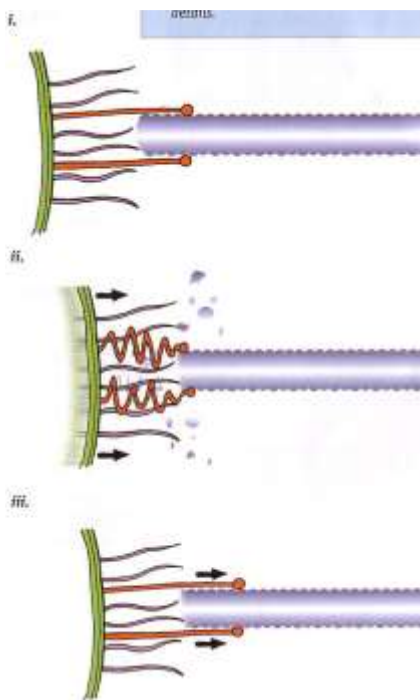


Figura 13.11. Posible mecanismo de transporte por acoplamiento con despolimerización. Ver el texto para detalles.

Los detalles de este esquema tipo oruga deben tomarse como altamente provisionales puesto que la complementación y la disposición de las proteínas

activadoras de microtúbulos está comenzando a emerger recién ahora. La evidencia es escasa. Una buena investigación sería comprobar si el transporte sucede tal como se lo implicó, en forma de movimiento desde un paso al próximo adyacente. En principio, este mecanismo de transporte es poco diferente al del capítulo previo: El transporte es promovido por un frente de reestructuración que impulsa a la proteína activadora hacia adelante. La diferencia surge a partir de la naturaleza idiosincrática del cinetocoro, el cual podría estar decididamente diseñado para vincular el transporte con la despolimerización. Por lo demás, el mecanismo es similar a aquel con el que hemos estado tratando.

La separación de los polos puede reanudarse una vez que el vínculo final entre cromátidas hermanas ha sido roto –momento hacia el cual la mayoría de cromátidas ya habrán progresado sustancialmente en dirección al polo. Los microtúbulos de cada medio-huso impulsan el flujo en direcciones opuestas (Fig. 13.12), empujando a los dos medios-husos a apartarse. El proceso de separación ahora es particularmente efectivo porque las cromátidas están atadas a los medios-husos, y al separarse los medios-husos, también lo hacen las cromátidas. La separación continúa hasta que los microtúbulos en el ecuador dejan de solaparse. Luego se detiene.

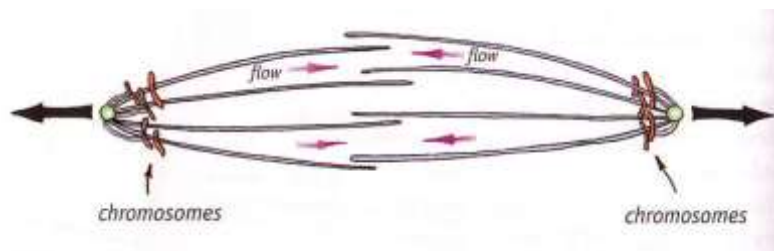


Figura 13.12. Una vez que las cromátidas son liberadas, la fuerza reactiva reanuda el empuje para separar los polos.

DIVISIÓN CITOPLASMÁTICA

Pese a que los eventos arriba descritos están orquestados para segregar los cromosomas, también preparan el escenario para el evento subsecuente –la división citoplasmática. El escenario comienza a estar preparado cuando las cromátidas hermanas se hallan alineadas en el ecuador. La densa placa ecuatorial desvía el flujo axial, el cual debe por ende curvarse radialmente y salir del huso por cualquiera de los costados del plato ecuatorial (Fig. 13.13). Debido a que los solutos salen hacia una zona de alta estructura conferida por los microtúbulos cercanos, las condiciones para la polimerización son apropiadas –alta concentración de soluto y alta estructura. Por lo tanto, los solutos abundantes incluyendo actina y miosina pueden eventualmente gelificar en forma de un anillo alrededor del ecuador del huso (Fig. 13.1).

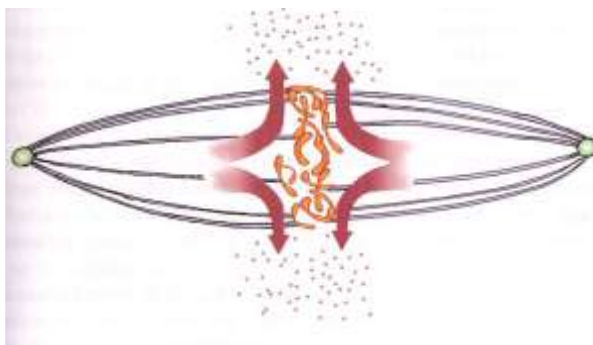


Figura 13.13. Los solutos salen del huso por zonas estrechas en cualquiera de ambos lados del ecuador, concentrando de esta forma los solutos.

La contracción de este anillo divide la célula físicamente en dos. Este proceso requiere un acortamiento importante, y la Figura 11.8 muestra que el gel de actina es bastante apto para la tarea. El gatillo bien podría ser el adelgazamiento de los microtúbulos que ocurre al despolimerizarse estos (Fig. 13.10): El adelgazamiento de los microtúbulos disminuye la estructura del agua dentro de la abertura del anillo, lo cual desplaza el equilibrio del anillo hacia la transición (Capítulo 8). Este mecanismo no excluye que puedan jugar un rol otros probables factores tales como la fosforilación de la miosina, pero el gatillo basado en la desestructuración puede proveer un vínculo apropiadamente carente de costuras entre la mitosis y la citocinesis.

El ciclo llega a un final cuando el gel contráctil se disuelve. El citoplasma y el material genético están ahora adecuadamente repartidos entre las incipientes células hijas. Los procesos que tuvieron lugar al principio del ciclo mitótico ahora pueden revertir, permitiendo a las células hijas restablecer sus configuraciones de funcionamiento y ocuparse de sus asuntos. Una célula se convirtió en dos.

PATOLOGÍA

Cuando la mitosis y la citocinesis se salen desenfrenadamente fuera de control, el resultado, desafortunadamente, es el cáncer. El tema del cáncer se deduce tan naturalmente de cualquier discusión respecto de la división celular que unas pocas especulaciones sobre la etiología parecen irresistibles.

Dentro del paradigma considerado, debería concederse una atención primordial a elementos que afectan no sólo a la proteína sino también a la estructuración del agua. La historia de la célula cancerosa data de varias décadas atrás cuando un médico, Raymond Damadian, fue al laboratorio de Gilbert Ling (a quien recordarán de anteriores capítulos) en busca de ayuda. Damadian había estado preguntándose si una diferencia de estructura del agua podría subyacer a patologías orgánicas, y empezó a explorar el potencial de la resonancia magnética nuclear como herramienta de comprobación de tales diferencias. La colaboración resultó siendo fructífera. Su evolución condujo a una tecnología de avanzada llamada representación óptica por resonancia magnética (en inglés, Magnetic Resonance imaging, MRI), de la cual Damadian posee la patente. Esta poderosa tecnología surgió directamente a partir del concepto de agua celular estructurada.

Una de las consecuencias de mayor alcance de la MRI fue que podía ser utilizada para distinguir células tumorales de células no-tumorales. La distinción se basaba en una aparente diferencia del agua celular, ya que las diferencias en los tiempos de dispersión de los protones del agua se notan en la imagen brindada por la MRI. El agua se presentaba menos estructurada en las células de tumores, y este resultado fue documentado ampliamente (por ejemplo, Damadian, 1971; Beall *et al.*, 1982). Ahora se hizo visible que gran parte de la diferencia entre células cancerosas y no cancerosas podría surgir a partir de diferencias en el contenido de iones paramagnéticos (Ling *et al.*, 1990). Sin embargo, queda claro a partir de estudios experimentales que las células sufren un cambio de estructuración del agua durante la mitosis (Cameron *et al.*, 1987), un cambio previsible a partir de la secuencia asociada de transiciones de fase. Por ende, los tejidos que sufren una desenfrenada división bien podrían mostrar al menos alguna diferencia de la estructuración acuosa en relación a aquellos que no la sufren.

Lo racional, entonces, es buscar agentes que puedan impactar sobre la estructuración del agua –ya que tales agentes deberían promover la mitosis y podrían promover la mitosis desenfrenada. Una pista interesante es que las células tumorales expresan proteínas de “firma”, las cuales surgen como consecuencia de una mutación. Entre los diferentes cánceres, proliferan diferentes proteínas de firma. Estas proteínas son huéspedes no deseados en la morada celular, y no pueden ser deportados fácilmente porque eluden el reconocimiento por parte del sistema inmune. Su poder destructivo es evidenciado por el éxito de terapias con anticuerpos dirigidos específicamente hacia su destrucción: la eliminación de estas proteínas efectivamente erradica el tumor.

En este contexto, una posibilidad a tomar en cuenta es un vínculo entre mutación y capacidad para la estructuración del agua. Las proteínas mutantes podrían no ser capaces de estructurar el agua tan efectivamente como las proteínas normales, de tipo salvaje. Esta especulación surge porque la capacidad para estructurar es un rasgo de diseño implícito en el paradigma propuesto –es responsable del establecimiento del estado básico de la célula. Al mismo tiempo, la proteína debe poseer la capacidad de actuar, lo cual comúnmente se traduce en una capacidad para desestructurar. El diseño proteico deberá por ende reflejar un equilibrio entre estas dos estrategias en competición, y en la mutante, ninguna de estas estrategias puede sobrevivir sin ser vituperada. La proteína “firma” probablemente sea funcionalmente inepta e inepta en su capacidad para estructurar el agua.

El desorden del agua tiene consecuencias predecibles para la mitosis. Dado que muchos de los eventos mitóticos involucran una transición entre el agua ordenada y desordenada, los factores que preservan el orden del agua inhibirán esas transiciones, mientras que los factores promotores del desorden las realzarán. Un medioambiente acuoso desordenado podrá por ende facilitar la mitosis –la célula será predispuesta hacia la replicación.

La hipótesis, entonces, es que el cáncer podría tener una etiología en gran parte no reconocida. El primer paso es una mutación disparada por cualquiera de una diversidad de agentes medioambiental o genéticamente basados. Si la proteína expresada no es destruida por el sistema inmune, se acumulará dentro de la célula. La proteína ocasiona su estrago a través de comprometer el ordenamiento del agua y de ese modo promover la mitosis. La célula comienza a proliferar, y debido a que las células hijas contienen a ambos, el gen mutado y su producto genético, continúan proliferando y eventualmente merman al cuerpo en sus limitados recursos.

Una predicción de esta hipótesis es que dos rumbos terapéuticos podrían probar ser efectivos. El primero es un ataque directo sobre la proteína, el cual ya parece ser asombrosamente efectivo. El segundo involucra al agua. Presumiblemente, los agentes que promueven el ordenamiento del agua inhibirían la proliferación tumoral. Por lo que yo sé, este enfoque todavía no ha sido ensayado. Ni se ha establecido si la reputada eficacia de algunos agentes anticancerígenos actuales podría yacer en un mecanismo como este.

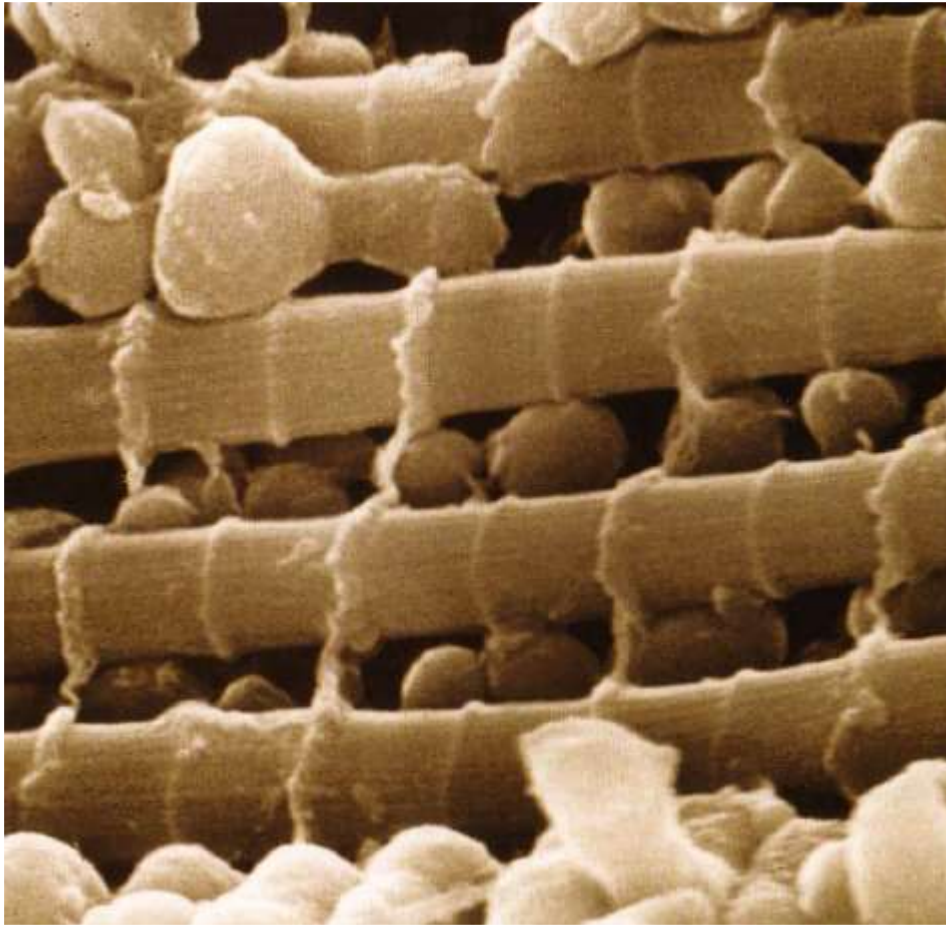
CONCLUSIÓN

La intrincada cadena de procesos colectivamente conocidos como mitosis parece en gran parte explicable mediante un mecanismo común –la transición de fase. La transición de fase de propagación logra lo básico: transporta los materiales de construcción a lo largo de los microtúbulos para la construcción del huso; impulsa las cromátidas hacia los polos para su segregación; y empuja a separarse a los dos medios-husos anticipadamente a la división celular. La mitosis, entonces, puede ser vista como una aplicación especializada de los principios del transporte (Capítulo 12), siendo los solutos transportados los materiales para la construcción del huso, y más tarde, de los cromosomas.

Un segundo y más sutil punto es que estas transiciones se llevan a cabo en bestias de carga funcionales que son recicladas. Los microtúbulos de las células en funcionamiento se disuelven preparándose para la mitosis –y luego se reensamblan para constituir el huso. Los elementos son re-utilizados. Los filamentos de actina del citoesqueleto también se disuelven, y se re-ensamblan subsecuentemente para formar el anillo contráctil. Incluso proteínas accesorias tales como la kinesina, la dineína y la miosina son recicladas para su uso en el proceso mitótico. Para el drama de la división celular, entonces, se necesitan pocos nuevos actores.

La división celular es, de esta manera, un proceso bastante conservador. Pese a que los personajes puedan estar diferentemente disfrazados para esta actuación, son los mismos actores que aquellos empleados por la célula para llevar a cabo sus actividades de rutina. Como resultado, sus roles están bien ensayados. Con actores familiares en roles familiares, la célula dirige el intrincado guión que transforma una célula en dos.

Habiendo dedicado tres capítulos al análisis del transporte de uno u otro tipo, viramos nuestra atención hacia otra de las principales tareas de la célula: la contracción. El proceso contráctil también emplea a actores conocidos, incluyendo a la actina y la miosina, así como a varios nuevos actores. La cuestión, una vez más, es si un rol inesperadamente central podría ser jugado por la transición de fase.



Miofibrillas del músculo de vuelo de la abeja, cortesía del Dr. Károly Trombitás.

CAPITULO 14: CONTRACCIÓN MUSCULAR

Los músculos están hechos de unidades contráctiles de un tamaño micronesimo llamadas sarcómeros, los cuales contienen tres tipos de filamentos: grueso, fino y conector (Fig. 14.1). Los filamentos gruesos y finos se reconocen por tener un papel central en la contracción. Los filamentos de conexión, identificados apenas recientemente gracias a contribuciones destacables de Koscak Maruyama y Kuan Wang, vinculan al filamento grueso con los extremos del sarcómero y sirven como el resorte molecular del sarcómero.

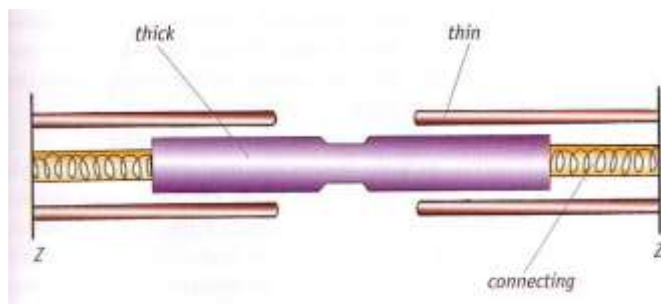


Figura 14.1. El sarcómero está construido en gran parte por filamentos gruesos, finos y conectores. Cada filamento grueso se halla típicamente rodeado por seis filamentos finos.

Los tres filamentos son polímeros: Los filamentos finos están constituidos en gran parte por repeticiones de actina monomérica; los filamentos gruesos están conformados alrededor de repeticiones de miosina; y los filamentos conectores de los vertebrados están construidos con titina, una enorme proteína consistente principalmente en repeticiones de campos tipo inmunoglobulina. Junto con agua –la cual es retenida en el sarcómero tan firmemente que incluso la centrifugación no puede removerla (Ling y Walton, 1976)- este conjunto de polímeros forma un entramado similar a un gel.

Una vez más, la cuestión de interés es si este gel se contrae a través de una transición de fase. Antes de pisar demasiado lejos dentro de semejante territorio aparentemente no mapeado, resulta prudente considerar la visión prevalente, la cual se halla inusualmente bien establecida. ¿Existen motivos para cuestionar su adecuación?

LA TEORÍA DEL PUENTE TRANSVERSO OSCILANTE

Hasta mediados de la década de 1950, se sostenía que la contracción muscular ocurre mediante un mecanismo suficientemente similar al que aquí sugeriremos como para ser considerado un progenitor. El rasgo dominante era el plegamiento proteico.

Con el descubrimiento de los filamentos interdigitantes a mediados de los 50', fue tentador abandonar la noción del plegamiento proteico, y suponer en lugar de ello que la contracción surgía a partir del puro deslizamiento del filamento. Esta suposición condujo a Hugh Huxley y a Sir Andrew Huxley (sin parentesco) a examinar independientemente si los filamentos permanecían a una longitud constante durante la contracción. Sus estudios con microscopía óptica fueron publicados espaldas con espaldas en *Nature* (Huxley y Hanson, 1954; Huxley y Niedergerke, 1954). Junto con un seguimiento más detallado (Huxley y Niedergerke, 1958), estos estudios se convirtieron en los trabajos cruciales de este campo.

Los estudios exploraron especímenes relajados y activados por igual. Los especímenes relajados eran estirados y soltados manualmente. Durante estas maniobras, el ancho de la banda A permaneció absolutamente invariable. Dado que el ancho de la banda A corresponde al largo del filamento grueso (Fig. 14.2), el resultado implicó que los filamentos gruesos no cambiaban de longitud. Esto consolidó la noción emergente del deslizamiento del filamento.

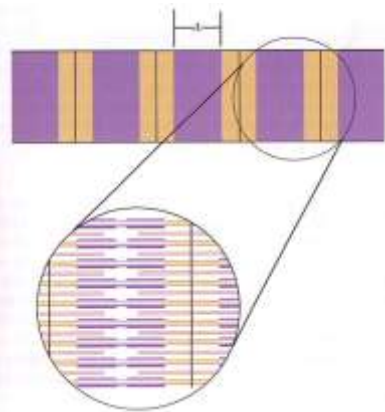


Figura 14.2. Esquematación por microscopía óptica de las estriaciones musculares (arriba), con la correspondiente estructura molecular (abajo). El ancho de la banda A corresponde a la longitud del filamento grueso.

Menos conclusivos, sin embargo, fueron los resultados obtenidos cuando la longitud del músculo cambiaba activamente, porque aquí el acortamiento del sarcómero estaba a veces acompañado por un estrechamiento de la banda A. El estrechamiento fue descartado como cuantitativamente inconsecuente en el estudio de Huxley-Hanson, y en el trabajo de Huxley-Niedergerke fue relegado a la limitada resolución del microscopio. Con estas desestimaciones, todos los resultados pudieron continuar siendo interpretables dentro del marco de la concepción de la longitud constante de los filamentos.

Estos “papers” espalda con espalda de los Huxleys, uno de quienes compartió el premio Nobel por su previo trabajo sobre corrientes de membrana, envió al paradigma del plegamiento proteico al sótano de las nociones mal engendradas. El paradigma de la longitud filamentosa constante obtuvo el control, y se ha mantenido extraordinariamente firme a pesar de los hallazgos de un acortamiento del filamento grueso o acortamiento de la banda A en más de 30 informes publicados subsecuentemente (para una revisión ver Pollack, 1983; Pollack, 1990).

Con la noción emergente de los filamentos corredizos, la naturaleza de la fuerza impulsora se volvió la cuestión central. ¿Qué podía propulsar el deslizamiento? No puedo resistirme aquí a trazar un paralelismo con el campo de la fisiología celular descrito en los capítulos introductorios del libro. Para acercarse a la verdad cimentada, era necesario descascarar capas de suposiciones fundamentales, cuya endeblez había dirigido equivocadamente el campo hacia conclusiones poco apropiadas. La situación aquí es análoga. Se asume que los filamentos son elementos pasivos de longitud esencialmente fija, conducidos uno más allá del otro por conductores ajenos. Sólo si la suposición de la longitud fija es validada sin ambigüedades se podrán establecer inferencias significativas respecto de la naturaleza de la fuerza propulsora.

El concepto de los filamentos corredizos, sin embargo, causó gran excitación en el campo muscular y una cantidad impresionante de investigadores fue

inspirada para buscar las piezas impulsoras. Estos investigadores pronto se decidieron por el mecanismo esquematizado en la Figura 14.3. En este mecanismo los puentes transversos se adhieren al filamento fino, pivotan, y luego se desconectan con la presencia de ATP, preparándose para el próximo ciclo. El pivotado del puente conduce al filamento fino hacia el centro del sarcómero, acortando de ese modo al sarcómero y al músculo. El mecanismo explica muchos rasgos conocidos de la contracción y se ha tornado por ende ampliamente aceptado (para una revisión, S.f. Spudich, 1994; H. E. Huxley, 1996; Block, 1996; Howard, 1997; Cooke, 1997).

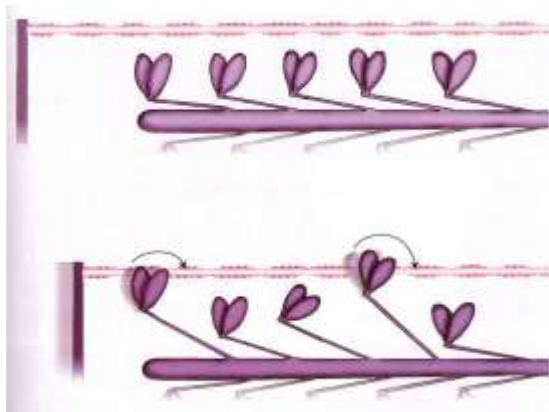


Figura 14.3. El mecanismo de la contracción muscular según los libros de texto. La rotación de los puentes cruzados impulsa al filamento fino más allá del grueso.

¿Entonces cuál es el problema? Además de la preocupación respecto del agregado sobre un incierto fundamento de filamentos de longitud constante, ¿existen buenos motivos para considerar como inadecuado a este mecanismo? Un tema central es la ausencia de evidencia respecto de la flexión del puente transverso. Para comprobar cambios en el ángulo del puente, numerosos enfoques a escala molecular han sido implementados (para una revisión, ver Thomas, 1987). La resonancia de barrido electrónico, la difracción de rayos X, y la polarización de fluorescencia han producido en gran parte resultados negativos, como asimismo la microscopía electrónica de alta resolución (Katayama, 1998). El más compasivo de estos resultados ha sido un cambio del ángulo de 3° medido sobre una cadena liviana de miosina (Irving *et al.*, 1995). Este cambio se queda corto por lejos respecto de los 45° previstos.

La ausencia de oscilación es sólo una entre diversas áreas de preocupación. Las preocupaciones cubren toda la gama desde la inestabilidad (Iwazumi, 1970), hasta la mecánica (Pollack, 1983), la estructura (Schutt y Lindberg, 1993, 1998), y la química (Oplatka, 1996, 1997). Muchas de estas preocupaciones están descritas en mi libro de 1990. Pero el condimento completo es deducido mucho mejor mediante la lectura de las revisiones originales, particularmente aquellas de Schutt y Lindberg y de Oplatka, cuya franqueza picante, rayana con el desprendimiento, entretiene mientras educa. También les recomiendo un intuitivo trabajo del difunto Graham Hoyle (1983), el cual ofrece algo de comprensión sobre el foco sostenido sobre paradigmas aparentemente improductivos en un capítulo titulado “¿Por qué los Científicos del Músculo `Pierden` Conocimiento?”

Aquí retomamos el hilo donde lo dejaron los pioneros medio siglo atrás. Cualquiera sea el modelo que evolucione se requerirá que cuadre no sólo con esta evidencia más antigua sino también con la evidencia de los años de intervalo que ha llegado a ser considerada como apoyo del actual paradigma “corredizo”. Por lo tanto la evidencia sobre transitorios mecánicos, tensión versus solapamiento de filamentos, movimiento de ATP, etc., debe ser

explicada, y refiero al lector al libro arriba mencionado (Pollack, 1990), donde ofrecemos un tratamiento más detallado. El foco aquí es sobre la evidencia relacionada más directamente con la validez del paradigma emergente –concretamente, con los cambios estructurales en cada uno de los tres filamentos poliméricos.

CONSIDERACIONES ESTRUCTURALES

La unidad funcional de la contracción es la miofibrilla, la cual comprende varios cientos de filamentos proteicos (Fig. 14.4). Muchas miofibrillas paralelas conforman la célula o fibra, y muchas fibras conforman el músculo. El conjunto es, por ende, jerárquico. La estructura de la miofibrilla es sorprendente en cuanto a la precisión casi cristalina con la cual los filamentos paralelos se alinean unos con otros. Tal alineamiento es alcanzado a través de un extensivo vínculo transversal a lo largo del sarcómero, tanto en la banda A como en la banda I.

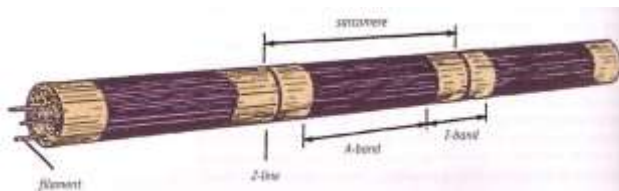


Figura 14.4. La miofibrilla es un marcado manojo de filamentos regularmente ordenados.

Los vínculos transversales son ilustrados en la Figura 14.5. El panel superior es una imagen de fractura por congelamiento, la cual revela los vínculos cruzados en forma similar a la viviente. El panel inferior es una sección ultrafina, la cual muestra el espaciamiento de la repetición axial de ~ 40 nm de las conexiones transversales. Este espaciamiento es una pista respecto de que el conector transversal podría ser la troponina (Pollack, 1990), una abundante proteína sarcomérica de la cual se sabe que liga a la actina y se repite a lo largo del sarcómero a intervalos de ~ 40 nm. La vinculación transversal es una regla general entre diversos filamentos de actina y por ello no resulta sorpresa alguna que ocurra en el sarcómero.

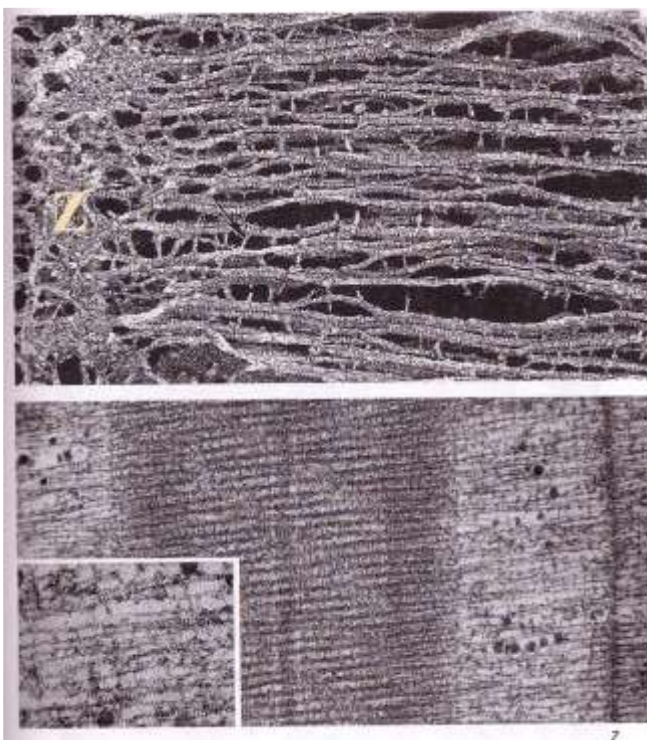


Figura 14.5. Arriba: Imagen por fractura de congelamiento de los filamentos de la banda I. La malla verticalmente orientada es la línea Z. La flecha indica la interconexión. Abajo: Sección ultra fina mostrando repetición regular de interconexiones de banda I. Vista desde un ángulo llano, abajo. El inserto muestra la banda I con una magnificación más alta. Micrografías cortesía de Peter Baatsen y Károly Trombitás.

Las interconexiones de la banda A se muestran en la Figura 14.6. El panel superior muestra un espécimen que ha sido estirado para retirar los filamentos finos del entramado y así reducir la congestión visual. El estiramiento distorsiona un tanto el entramado pero no obstante ello las conexiones cruzadas entre filamentos gruesos quedan claras. El panel inferior muestra un corte transversal. El sarcómero ha sido extendido en alrededor de un 30% de su longitud de reposo y el corte arañó las puntas de los filamentos finos, algunos de los cuales se ven como pequeños puntos entre los puntos de los filamentos gruesos más abundantes y de mayor tamaño. Las interconexiones entre filamentos gruesos son evidentes.

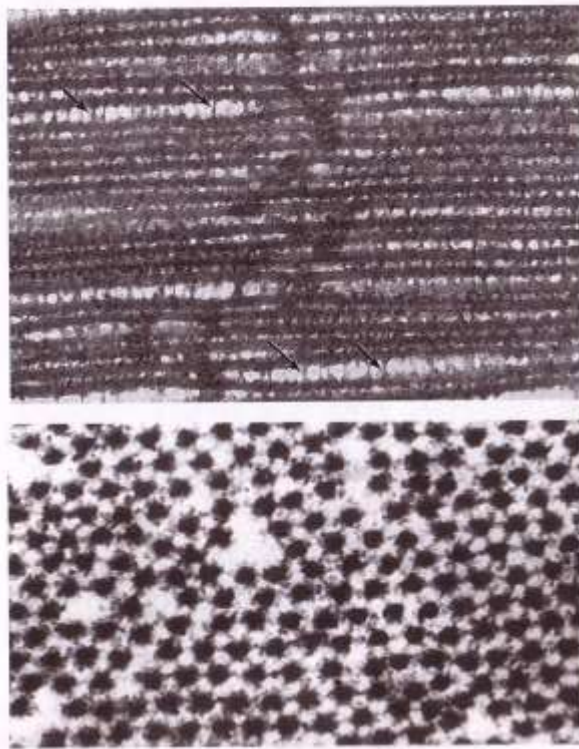


Figura 14.6. Arriba: Sección fina de músculo de abeja desplegado para retirar los filamentos finos del entramado. Los filamentos gruesos permanecen. Las flechas muestran interconexiones. Abajo: sección transversal de sarcómero de conejo moderadamente estirado. Las interconexiones grueso-grueso son aparentes. Micrografías cortesía de Károly Trombitás y Victor Popov.

Las interconexiones grueso-con-grueso están casi certeramente hechas de miosina, dado que la miosina es la única proteína de la banda A en cantidad suficiente como para explicar estructuras tan abundantes. La forma en que la miosina podría presentarse físicamente es mostrada en la Figura 14.7. Vínculos de longitud apropiada pueden ser creados si las cabezas de los puentes transversales de los filamentos adyacentes se ligan unas con otras por sus puntas (Pollack, 1990). Este elemento esencialmente estático podría explicar por qué han fracasado los intentos de demostrar la inclinación de las cabezas de miosina.

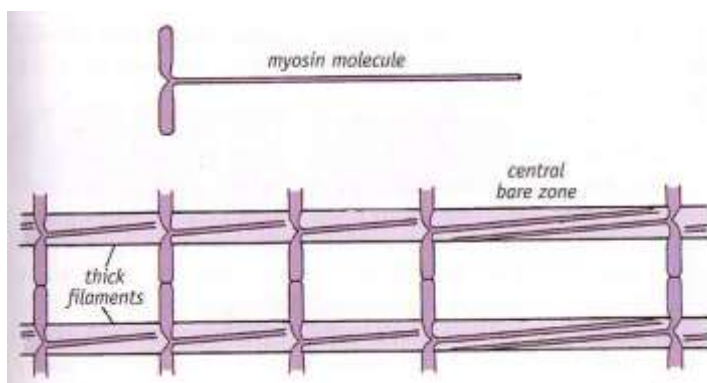


Figura 14.7. Origen probable de la interconexión del filamento grueso.

Los vínculos transversales alinean los filamentos y de ese modo confieren regularidad al entramado. También mantienen la integridad del entramado a través de limitar la tumefacción. Los polímeros altamente cargados tales como los del sarcómeros pueden embeber agua hasta miles de veces su volumen (Osada y Gong, 1993), y en última instancia pueden disolverse si no están ligados transversalmente. Las conexiones transversales sarcoméricas restringen la expansión de un modo bastante igual al cual lo hacen en el citoesqueleto periférico (Capítulo 10). El entramado filamentoso muscular, entonces, es esencialmente un gel polimérico altamente embebido en agua y conectado mediante vínculos transversales. Debido a su sorprendente regularidad, uno podría afirmar que es un “supergel”.

Este supergel está evidentemente diseñado para contraerse, y ciertos rasgos de su comportamiento implican aún otra transición de fase. Los disparadores, por ejemplo, son los mismos que aquellos de transiciones es geles poliméricos ordinarios (Tabla 8.1). La contracción en células demembradas puede ser iniciada por: incremento de sal, cambio en el pH, salto de temperatura –incluso la corriente eléctrica disparará la contracción de una miofibrilla aislada (Garamvolgyi, 1959). Y como las transiciones de geles poliméricos, el disparo es de tipo “filo de navaja”. Nada ocurre hasta que se cruza un umbral, más allá del cual la acción es masiva (Figura 14.8).

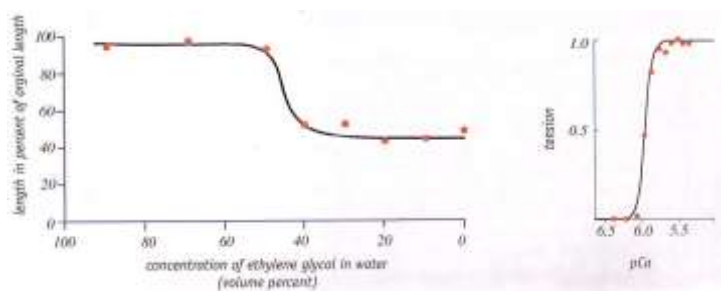


Figura 14.8. Comportamiento crítico, tipo “todo o nada” del músculo. Según Hoeve *et al.* (1963) y Brandt *et al.* (1984).

Con la contracción, el agua estructurada se torna desestructurada, y es liberada fácilmente desde el entramado (Bratton *et al.*, 1965; Hazelwood *et al.*, 1969; Ogatta, 1996; Yamada, 1998).

Irónicamente, semejante comportamiento crítico ha sido evidenciado en estudios modelo conducidos hace más de medio siglo atrás, y esta es quizás la razón por la cual se presumió que la contracción involucraba algo similar a una transición de fase. Los experimentos en la vanguardia de la era se enfocaron sobre suspensiones de actina y miosina. Tales suspensiones podrían formar un gel, cuya condensación fue considerada un modelo de trabajo de la contracción muscular. El gel permanecía estable hasta que las condiciones ambientales apenas trasponían un umbral crítico; luego se contraía masivamente. Mientras se contraía, la matriz se plegaba y el agua era liberada –de forma bastante igual a como es liberada en el gel polimérico (Fig. 14.9).

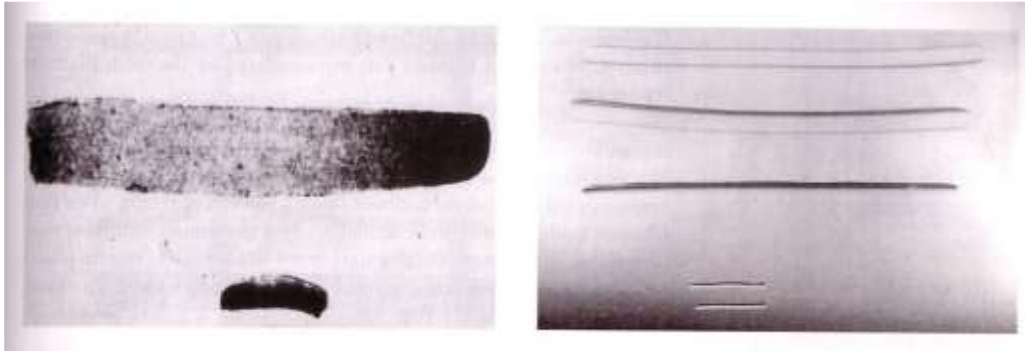


Figura 14.9. Contracción del gel de actomiosina disparado por una concentración creciente de ATP (izquierda). Comparar con la contracción del gel de poliacrilamida (derecha) cuando la proporción entre solvente orgánico y no orgánico es traspasada progresivamente pasando un umbral (de arriba a abajo). Según Szent-Györgyi, 1951 (izquierda) y Tanaka, 1981 (derecha).

Estos comportamientos críticos llevan la inconfundible firma de las transiciones de fase. La firma es evidente en el gel aleatorio (Fig. 14.9), así como también en el entramado organizado (Fig. 14.8). La cuestión es el sitio exacto de la transición de fase –el sarcómero está conformado por tres tipos de filamentos, y en teoría, cualquiera (o todos) de estos filamentos podría mediar la transición. Consideramos estos tres filamentos uno por uno, explorando si cada uno podría sufrir una transición de fase molecular.

¿TRANSICIÓN DE FASE DEL FILAMENTO FINO?

Los filamentos finos están hechos principalmente de actina. La evidencia respecto de una transición propagándose a lo largo del filamento de actina es importante (ver Capítulo 11), y estudios modernos apoyan un cambio estructural similar en los filamentos finos (para una revisión, ver dos Remedios y Moens, 1995; Pollack, 1996; Schutt y Lindberg, 1998). La evidencia cristalográfica, por ejemplo, muestra que el empaquetamiento de la actina a lo largo del filamento fino puede ocurrir en dos configuraciones –una configuración “larga” y una más corta, siendo la diferencia de longitud de 10 – 15% (Schutt y Lindberg, 1992). Semejante cambio de longitud podría ser impulsado por una condensación inducida por calcio similar a la que se ve en el citoesqueleto que contiene actina (Capítulo 8). Pese a que el mecanismo preciso de esta transición requiere un estudio ulterior, la evidencia anterior implica que cualquier transición estructural que se propaga a lo largo del filamento de actina se propaga similarmente a lo largo del filamento fino.

A través de un mecanismo como este, los filamentos de actina pueden impulsar solutos a lo largo de su longitud (Capítulo 11). Varios solutos son conducidos, incluyendo a la miosina –la cual es de hecho requerida para que continúe la propagación. En el sarcómero, en contraste, la miosina yace en un marco fijo. Surge el cuestionamiento respecto de si el movimiento relativo podría tomar lugar no obstante ello –manifestado como traslación del filamento fino más allá de este marco. ¿Podría una transición de actina propagativa impulsar al filamento fino más allá de las miosinas fijadas sobre el marco del filamento grueso?

Un posible vehículo para tal acción es el mecanismo de oruga (Capítulo 8). Recuerden que un gel en forma de barra podía adelantarse incrementalmente a lo largo de un riel con dientes de sierra mediante repetidos ciclos de plegamiento y enderezamiento. El filamento fino podría avanzar por sí mismo similarmente. Mediante una transición de acortamiento que se propaga, el filamento podría reptar sobre un marco enrejado de enlaces transversales de miosina, con cada ciclo adelantando al filamento incrementalmente hacia el centro del sarcómero (Fig. 14.10).

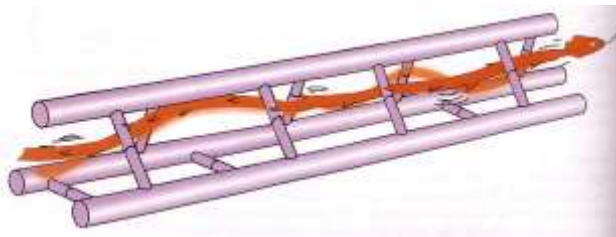


Figura 14.10. Modelo de reptación en el cual el filamento de actina serpentea abriéndose camino hacia el centro del sarcómero.

Entre las predicciones respecto de un modelo como este se halla la de que la función dependerá críticamente de la integridad de la estructura de actina. Si el rol del filamento de actina es tan central para la contracción como se lo ha implicado, incluso sutiles alteraciones en la estructura de la actina que producen un cambio morfológico pequeño o indetectable podrían impactar seriamente el desempeño contráctil. De hecho, los mecanismos son afectados profundamente por la segmentación de un único enlace molecular en la actina, o por la sustitución cautelosa de un único residuo (Schwyter *et al.*, 1990; Drummond *et al.*, 1990). Y el enlazamiento transversal de residuos en monómeros contiguos de actina posee un efecto dramático sobre la motilidad y la mecánica (Kim *et al.*, 1998). De esta forma, el filamento no se comporta como una simple barra de atadura.

Dado que el mecanismo de transición propagativa es similar al mecanismo de la actina del Capítulo 9, otra predicción es el flujo sarcomérico. Todavía no se ha constatado si el flujo ocurre en el sarcómero; sin embargo, sistemas *in vitro* derivados a partir de actina muscular sí presentan flujo (Tirosh y Oplatka, 1982). El flujo en el sarcómero podría transportar enzimas y sustratos esenciales hasta sus sitios previstos. También podría mediar el desplazamiento del agua que deberá ocurrir mientras el sarcómero se acorta y cambia de forma.

La predicción quizás más crítica de todas es el avance cuántico previsto del filamento fino (Fig. 14.11). Con cada ciclo de propagación, el filamento avanza a través de un paso. El paso finaliza cuando la actina se re-liga a la miosina. Dado que la ligadura a la interconexión deberá involucrar a uno o a otro monómero de actina a lo largo del filamento, el avance del filamento deberá ser un múltiplo íntegro del espacio de la repetición de la actina. La magnitud de traslación debería ser cuántica.

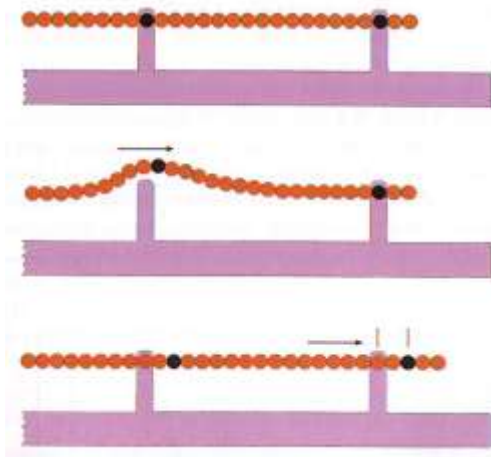


Figura 14.11. El modelo de reptación predice que cada avance del filamento fino será un múltiplo íntegro de la repetición del monómero de actina a lo largo del filamento.

Esta predicción está confirmada (Fig. 14.12). El tamaño del paso es, en efecto, un múltiplo íntegro del espaciamento del monómero de actina. Este resultado es visto en ambos, el sistema molecular aislado (Kitamura *et al.*, 1999), y el sarcómero intacto (Blyakhman *et al.*, 1999). La coincidencia es lo suficientemente llamativa como para sugerir que un mecanismo muy similar al considerado debe jugar un importante rol.

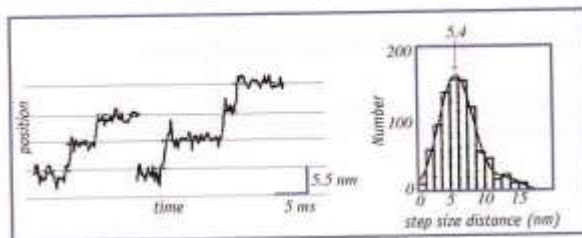
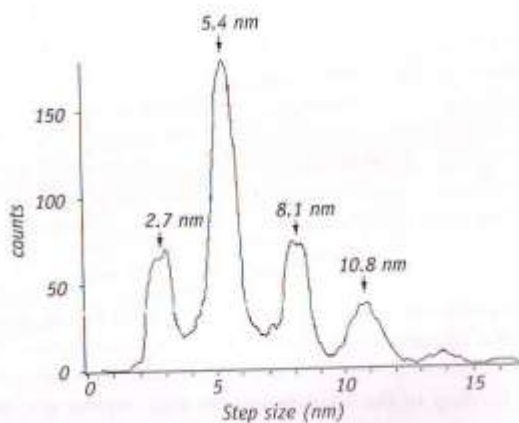


Figura 14.12. Arriba: Traslación paso a paso de una única molécula de miosina a lo largo de los filamentos de actina (de Kitamura *et al.*, 1999). El tamaño del paso es $\sim 5,4$ nm, lo cual es equivalente al espaciamento de la actina a lo largo de una hebra individual de actina. Abajo: Tamaño del paso de acortamiento del sarcómero medido en miofibrillas activadas (Yakovenko, Blyakhman y Pollack). Las espigas del histograma están separadas por $\frac{1}{2}$ de 5,4 nm. La mitad surge porque las dos hebras del filamento están desplazadas axialmente por la mitad de 5,4 nm (ver Fig. 11.1). La repetición axial a lo largo del filamento es por ende de $\frac{1}{2}$ de 5,4 nm, o 2,7 nm –la misma que el paso cuántico.



¿TRANSICIÓN DE FASE DEL FILAMENTO GRUESO?

Pese a que se presume que los filamentos gruesos permanecen a una longitud constante durante la contracción, en muchas instancias los filamentos pueden acortarse. Anteriormente aludimos a la evidencia respecto del acortamiento. La selección completa de evidencias puede ser recogida a partir de dos revisiones detalladas (Pollack, 1983, 1990), o mejor aún, de la lectura de los trabajos originales citados en esas revisiones. Ejemplos representativos del acortamiento del filamento grueso son presentados en la galería de la Figura 14.13. La extensión del acortamiento varía con la activación y las condiciones de carga, pero un 20 -30% de la longitud inicial es lo típico. El acortamiento se ve tanto en el microscopio óptico (bandas A) como en el microscopio

electrónico (filamentos gruesos); es también visto en especímenes de vertebrados e invertebrados por igual, y en una cantidad considerable de laboratorios.

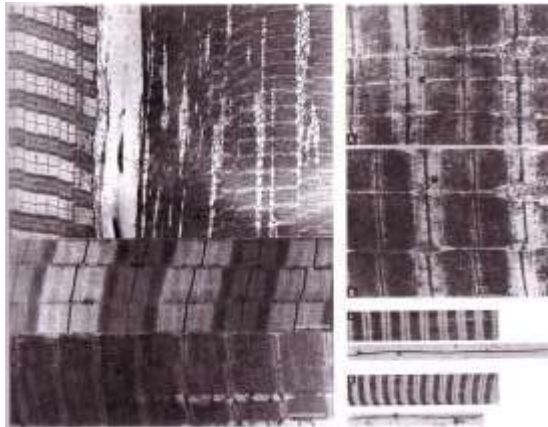


Figura 14.13. Galería de ejemplos de acortamiento de filamento grueso. Izquierda superior: fibras juntas en el mismo campo de micrografía electrónica –la izquierda no contraída, la derecha contraída. Noten la diferencia de ancho de la banda A. Todos los otros paneles: superior, descontraído; inferior, contraído. El panel inferior derecho también muestra filamentos gruesos extraídos de especímenes relajados y contraídos. Para detalles, ver Pollack (1990, Pág. 92 – 93).

Para apreciar cómo podría surgir el acortamiento, uno necesita tomar en cuenta la estructura del filamento. El filamento grueso está construido por muchas repeticiones de miosina, una molécula que contiene dos cabezas globulares y una cola con forma de barra (Fig. 14.14). Las cabezas se proyectan hacia fuera en ángulos rectos para formar los enlaces cruzados radiales (Fig. 14.7, arriba), mientras que las barras se fusionan para componer la columna vertebral del filamento. Si la columna debe acortarse, las barras constituyentes deberán, por ende, jugar algún rol.

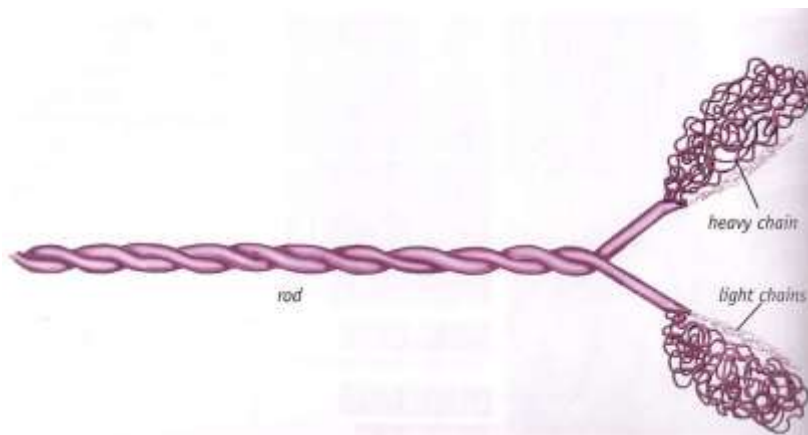


Figura 14.14. Estructura molecular de la molécula de miosina.

Pero resulta que las barras mismas pueden acortarse. La barra es una alfa-hélice –una estructura en forma de varilla capaz de atravesar una transición hacia un espiral aleatorio. La de hélice hacia espiral es una transición de fase clásica. Es disparada cuando los puentes de hidrógeno que mantienen unida la hélice ceden, permitiéndole a la hélice “derretirse” hacia una estructura aleatoria cuya longitud de equilibrio es más corta que la de la hélice. De esta forma, la transición es generadora de tensión. El proceso se parece a lo que pasa si pones tu suéter de lana fina dentro del secarropa y programas la temperatura demasiado alta. Con el filamento grueso, sin embargo, el evento de acortamiento es más felizmente reversible.

Los detalles sobre la transición de fase del bastón de miosina son razonablemente bien conocidos. A lo largo del bastón, hacia alrededor de 1/3 del tramo desde la cabeza hasta la cola, se halla una región que es peculiarmente diferente al resto debido a una alta incidencia de residuos positivamente cargados. Es esta la región que sufre la transición (Fig. 14.15).

Mientras lo hace, el bastón se acorta en unos 15 -20 nm (Walzthöny *et al.*, 1986^{a, b}; Walker y Trinick, 1986). La fuerza generada por semejante transición es la magnitud correcta como para explicar la tensión muscular completa (Harrington, 1979). Por lo tanto, el filamento grueso se acorta porque las varillas constituyentes se acortan.

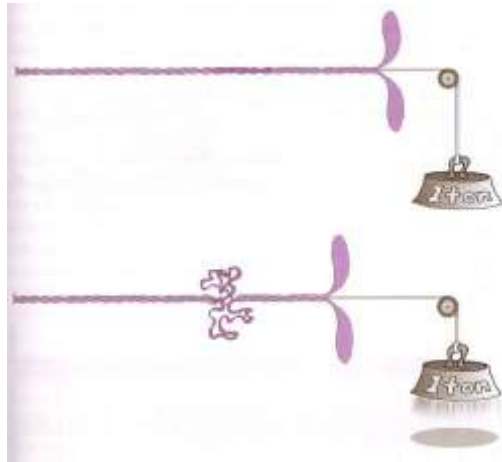


Figura 14.15. La transición de enroscado de hélice en la barra de miosina es un evento generador de trabajo.

El acortamiento del filamento podría progresar en cualquiera de dos modos – todas las barras se acortan simultáneamente, o las barras individuales se acortan secuencialmente, una a la vez. La primera opción es incompatible con la evidencia obtenida por difracción de rayos X, porque durante la contracción no se ve una disminución progresiva del espaciado de la repetición de miosina. El mecanismo de una molécula por vez preserva la constancia del espaciado en las regiones del filamento que todavía no se acortaron, y concuerda, por tanto, con la evidencia de la difracción de rayos X.

En un modelo tan secuencial las transiciones podrían empezar por ambos extremos del filamento y progresar hacia adentro; o, en una estrategia que encaja naturalmente con la arquitectura molecular (Pollack, 1990), podrían comenzar por el punto de simetría central del filamento y progresar hacia el exterior (Fig. 14.16). De ambas formas, una transición permite la próxima, y el filamento se acorta de a un paso por vez hacia el próximo adyacente. Se prevé que la medida del paso, en base a consideraciones estructurales, es un múltiplo de 2,7 nm (Pollack, 1990). Por lo tanto, ambos mecanismos, el de la actina y el de la miosina, producen pasos con el mismo paradigma de tamaño.

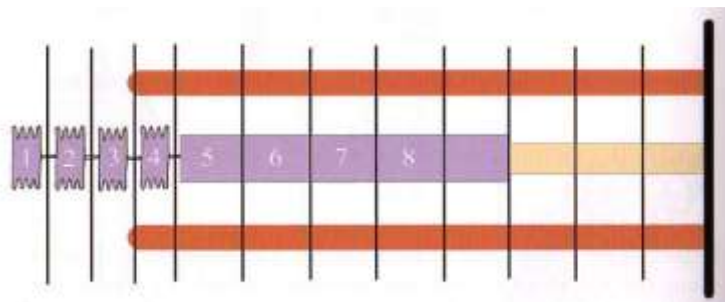


Figura 14.16. Modelo de acortamiento por pasos del filamento grueso.

¿TRANSICIÓN DE FASE DEL FILAMENTO CONECTOR?

El filamento de conexión (titina) es el tercer miembro del conjunto de filamentos y además otro candidato para la transición de fase. El filamento está conformado por un cordel axial de repeticiones de campos. De estos campos repetidos, el más abundante es por lejos el campo semejante a una inmunoglobulina (Ig), el cual tiene dos estados –plegado y desplegado. El

estado plegado es un beta-barril compacto, corto, mientras que el estado desplegado es largo (Fig. 14.17). Por lo tanto, el estiramiento impuesto sobre un filamento conector puede ser realizado a través de una serie de despliegues de dominios.



Figura 14.17. El campo de la inmunoglobulina es más corto en el estado plegado (izquierda) que en el estado desplegado (derecha).

El paradigma del despliegue ha sido confirmado mediante el estiramiento de constructos sub-moleculares consistentes en un cordel de campos de Ig (Rief *et al.*, 1997). El estrechamiento impuesto suavemente produjo una respuesta de tensión en dientes de sierra, nunca excediendo la cantidad de dientes a la cantidad de campos (Fig. 14.18 A); esto implicó una sucesión de despliegues de campos. El modelo del despliegue de campos fue confirmado en otro experimento sobre una molécula individual de titina (Tskhovrebova *et al.*, 1997). Aquí la molécula fue estirada abruptamente y mantenida así. El estiramiento aumenta la tensión, la cual desplaza el equilibrio hacia desplegada. Si los campos pasan a desplegarse a una longitud constante del espécimen, la tensión debería decaer (relajación del estrés), y el decaimiento previsto fue observado. Sin embargo, el decaimiento ocurrió con una modalidad paso a paso, nuevamente implicando una serie de despliegues (Fig. 14.18 B).

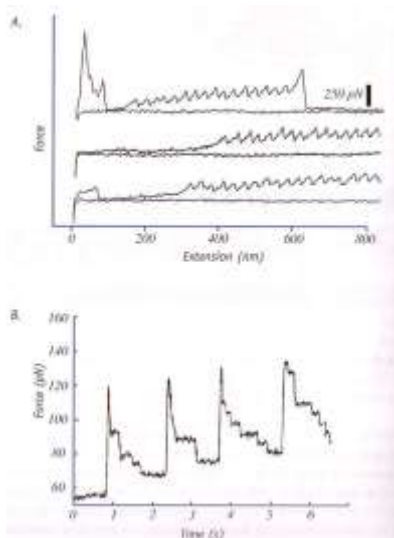


Figura 14.18. A: Respuesta al estiramiento escalonado de un único filamento de titina (Rief *et al.*, 1997). B: Respuesta a una sucesión de pasos de alargamiento-y-retención (Tskhovrebova *et al.*, 1997).

Con este modelo, el filamento conector se estira mediante una sucesión de despliegues, y se acorta mediante una sucesión de plegamientos. Los plegamientos parecen tomar un tiempo apreciable, de modo que un mecanismo de acortamiento alternativo, quizás entrópico, también podría ser pertinente – pero la aptitud para un comportamiento campo por campo es mostrada claramente. Con cada evento de plegamiento se libera un paquete de energía potencial, el cual puede realizar un trabajo. De esta forma, el filamento conector estirado es bastante parecido a un resorte extendido que puede en última instancia acortarse campo por campo –por pasos.

El filamento conector, sin embargo, podría consistir no sólo de titina. La evidencia de que el filamento conector pueda también contener hebras de tropomiosina es revisada en el Capítulo 10 de mi libro sobre el músculo (Pollack, 1990), y creo que esta evidencia es sustancial. Las moléculas de tropomiosina poseen cargas superficiales que se repiten axialmente cada ~ 2,2 nm (Katayama y Nonomura, 1979), y resulta relevante que cuando el filamento conector en miofibrillas individuales es estirado o liberado, la dimensión del paso es de 2,3 nm (Blyakhman *et al.*, 1999). Por lo tanto, los pasos del filamento conector podrían estar asociados con el deslizamiento / derretimiento de moléculas de tropomiosina, precisamente como los pasos de acortamiento del filamento grueso parecen asociarse con el deslizamiento / derretimiento de moléculas de miosina (Pollack, 1990).

Los eventos de plegamiento-despliegue descritos en esta sección se refieren a especímenes estirados o soltados en el estado inactivado. Por el otro lado, los factores asociados con la activación tales como el incremento del calcio libre sí impactan comúnmente sobre el equilibrio plegamiento-despliegue, y si hubieran de desplazar el equilibrio hacia el plegamiento, el filamento conector, efectivamente, se contraería. Los filamentos conectores podrían entonces contribuir a la tensión activa y al acortamiento. En el presente existe escasa información como para indicar si este podría ser el caso –excepto quizás por el clásico estudio de Endo (1972), quien mostró que cuando la concentración de calcio era llevada apenas por sobre el nivel de reposo, la tensión de reposo viraba hacia arriba en todas las longitudes. Ya sean realmente activables o meramente inertes, los filamentos conectores extendidos aportan inevitablemente una fuerza retráctil, de modo que un modesto aporte al acortamiento del sarcómero es inevitable.

LA MÁQUINA INTEGRADA

Tal parece, entonces, que la fuerza ostentada por la maquinaria contráctil es extraída a partir de aportes de sus tres filamentos en total –grueso, fino y conector. Todos los filamentos se acortan. El acortamiento de los filamentos acorta al sarcómero.

Este mecanismo prosigue a lo largo de los lineamientos generales anticipados por Albert Szent-Györgyi, Aharon Katchalsky, Paul Flory y otros pioneros de la era “pre-filamentos corredizos”. En aquella época había quedado claro que las proteínas musculares se acortan, pero faltaban detalles sobre los mecanismos. Ahora parece que el acortamiento está basado en los tres filamentos, y que en cada caso el mecanismo probable es una transición de fase: condensación monomérica, transición hélice-espiral, o transición plegamiento-despliegue. En el filamento fino, la transición se propaga repetitivamente, adelantando al filamento cada ciclo incrementalmente. En los filamentos grueso y conector, los acortamientos locales son acumulativos y se traducen directamente en un acortamiento del sarcómero.

Debido a que los tres filamentos se acortan en incrementos discontinuos, se prevé que el sarcómero se contrae por pasos. Esto está confirmado. El acortamiento paso a paso se observa en sarcómeros individuales de miofibrillas individuales, así como también en especímenes de escala variablemente mayor hasta células enteras (Pollack *et al.*, 1997; Delay *et al.*, 1999; Granzier *et al.*, 1987; Yang *et al.*, 1998; Blyakhman *et al.*, 1999). Tales

observaciones no sólo confirman la discontinuidad del proceso subyacente, sino también el alto cooperativismo característico de las transiciones de fase en general.

Los aportes de los tres filamentos se integran de forma complementaria. En el estado inactivado, el mediador exclusivo del cambio en la longitud del sarcómero es el filamento conector –los otros filamentos no cambian de longitud. Cuando la activación cruza un umbral, la contracción activa puede comenzar con el filamento fino, que se arrima, paso a paso, hacia el centro del sarcómero. Pero el mecanismo del filamento fino tiene sus limitaciones: del mismo modo en que el progreso de la oruga hacia arriba puede ser frustrado por un peso añadido, se prevé que la traslación del filamento fino termine si la carga se torna demasiado pesada. A partir de cálculos sobre la tensión desarrollada por un filamento fino individual (Ishijima *et al.*, 1991; Molrel, 1991), la carga crítica parece ser de alrededor de 1/3 de la máxima tensión activa. Más allá de esa carga el filamento fino no puede avanzar y meramente se pega a los enlaces transversales de la miosina.

El agente operativo restante a estas altas cargas es el filamento grueso. El acortamiento del filamento grueso es el arma pesada del sarcómero – produciendo una tensión activa completa, y contrayéndose contra cargas formidables. Semejante capacidad de producción de trabajo es impresionante y quizás exclusiva en la biología.

Debido a que los alcances operativos de los tres procesos son aproximadamente complementarios, el dominio de la contracción sarcomérica es extensivo. Esto le confiere versatilidad al sistema. Donde los alcances sí se solapan, la suma realza el poder contráctil. Por lo tanto, la máquina integrada es tanto más versátil como también más poderosa que las primitivas organelas contráctiles tales como el espasmonema, el cual contiene sólo una proteína de acortamiento en vez de tres (Moriyama *et al.*, 1996). El músculo es una organela evolucionada que aprovecha con maestría todas las avenidas practicables de la producción de trabajo.

Con este capítulo concluimos la discusión sobre los procesos celulares –no porque todos los procesos hayan sido agotados sino porque este volumen necesita acercarse a un cierre. Para cada uno de estos procesos, hallamos evidencia de que una u otra transición de fase juega un rol. El reconocimiento de la relevancia de la transición de fase no es enteramente novedoso u original –en varias instancias las transiciones de fase han sido perseguidas por otros grupos, quienes continuaron reuniendo evidencias de apoyo sustanciales. Pero la fuerza colectiva de esta evidencia ha permanecido débil porque el apoyo ha sido organela-específico y por ende disperso a través de toda la literatura.

Los capítulos han mostrado, no obstante, que la transición de fase puede ser un mecanismo común entre muchas organelas. Provee explicaciones directas para procesos de otra forma difíciles de explicar lógicamente y coherentemente. Es simple en su resolución –o encendido o apagado; y es poderosa en su efectividad –un cambio ambiental sutil dispara una respuesta masiva. Para este autor, parece estar imbuida con la estampa de la elegancia subestimada previsible de los paradigmas de la Madre Naturaleza.

SECCIÓN V

ATANDO CABOS SUELTOS

Esta sección considera temas comunes a los capítulos precedentes. Comienza con la evolución celular y la energética, y luego procede a explorar los temas subyacentes que integran el material del libro.



Implosión del estadio deportivo Kingdome de Seattle.

CAPITULO 15: ENERGÍA

Figura 15.1. El Seattle Kingdome, a punto de derrumbarse en Marzo de 2000, gatillado por pequeñas cargas explosivas plantadas en sitios críticos por todas partes de la estructura. Con permiso, Seattle Times.

Son varios los ejemplos del empuje de energía potencial entre los procesos celulares. En la vesícula secretoria, un resorte polimérico comprimido libera energía almacenada a través de su estiramiento. En el filamento grueso muscular, un bastón alfa-helicoidal extendido se derrite tornándose en una bobina de baja energía. En el anillo contráctil citoquinético, una matriz de filamentos actínicos hidratada, expandida, provee energía almacenada mediante condensación. En cada caso, un trabajo es realizado mediante el uso de energía que de algún modo había sido almacenada en la organela de forma previa a la acción.

El almacenamiento de energía tiene sentido. La pre-movilización de energía es a menudo la ruta más eficaz, y ciertamente la más confiable. El desafío es restaurar la energía potencial involucrada durante cada acción, por lo cual exploraremos el mecanismo mediante el cual la restauración energética es lograda.

Para resolver este interrogante, buscaremos pistas en el origen de la vida. Las formas de vida temprana requerían energía tanto como lo hacen las contemporáneas, pero existían pocos adornos. Las estrategias energéticas subyacentes, por ende, debieron haber sido más transparentes que en las formas de vida actuales, en las cuales la complejidad puede oscurecer los fundamentos. Si las vías energéticas de hoy evolucionaron a partir de estrategias simples utilizadas inicialmente, entonces su identificación constituye un buen lugar para empezar.

ORDEN

Antes de retroceder unos pocos billones de años, vale la pena recapitular un principio energético básico. De acuerdo con la segunda ley de la Termodinámica, la energía viene en dos formas. Una es la energía química y la otra es el orden. La primera es familiar. La segunda es menos conocida y por ende potencialmente intimidante. El ordenamiento requiere un gasto de energía, el cual puede luego ser devuelto en tanto el orden se abre camino.

Para ilustrar el rol del ordenamiento biológico consideremos la célula muscular. Inicialmente, el agua es ordenada alrededor de los filamentos gruesos y finos, los cuales se hallan en sus estados energéticos de alto potencial extendidos. El orden luego da lugar al desorden: a medida que los filamentos se contraen y el agua circundante es liberada hacia el desorden, la energía potencial es cedida en forma de trabajo mecánico y calor. Luego el sistema debe ser recebado –los

filamentos necesitan ser re-alargados y el agua necesita ser reestructurada. El reordenamiento requiere energía.

La energía asociada con el ordenamiento y el desordenamiento en la célula puede ser sustancial. Tales efectos dependen de la cantidad de moléculas participante, y en el caso del agua el número es enorme –por lo menos 10.000 veces mayor que todas las demás moléculas intracelulares. Por ende, aún si la contribución energética de cada molécula fuese modesta, la sumatoria de la energía dispuesta a través del desordenamiento del agua –sin mencionar el desordenamiento proteico- podría ser sustancial.

Que el ordenamiento podría ser una característica de significancia central para la biología no es sorprendente ya que la termodinámica precedió a la vida. El mero acto de crear una entidad pre-celular a partir de un mar de solutos dispersos es un ejemplo de ordenamiento. El ordenamiento también es reflejado en la estructura interna de la célula: los monómeros se alinean hacia polímeros, los polímeros se fusionan en matrices, y las matrices se ensamblan formando organelas. En cada caso, elementos dispersos se incorporan a estructuras ordenadas de mayor escala. El orden estructural es, de hecho, la marca distintiva de la vida –tal como la célula se debilita y muere, lo mismo ocurre con el orden. Mientras que todo esto pueda parecer obvio, conlleva una implicación con algo de significancia: el orden, el puro sello identificador del estado viviente, es, en realidad, un mecanismo disimulado para el almacenamiento de energía potencial. Como mínimo una parte de la energía de la célula puede ser almacenada bajo la forma de orden.

Entonces, resulta un desafío el determinar cómo la energía puede ser utilizada para crear orden estructural, desafío que enfrentaremos observando las raíces del árbol de la vida, donde se originaron las estrategias energéticas subyacentes. El campo de la biocosmología es una disciplina en sí misma que aquí consideraremos sólo brevemente, restringiéndonos a identificar estrategias básicas mediante las cuales la energía es usada para crear orden.

ORÍGENES

La vida comenzó cuando la tierra era relativamente joven –como mínimo 3.800 millones de años atrás según los registros fósiles. Se presume un origen acuático, no sólo porque el agua es crítica para la vida, sino porque muchos procariotas primitivos hoy se pueden encontrar en el agua, cerca de profundos respiraderos hidrotermales que “humean” gases calientes conteniendo hidrógeno, amoníaco y metano.

Las condiciones atmosféricas en la naciente tierra diferían respecto de las actuales. Para empezar, la atmósfera contenía muy poco o nada de oxígeno. Esto es inferido a partir de antiguos depósitos de hierro, los cuales no muestran signo alguno de oxidación. El exacto contenido atmosférico es debatido, pero es bastante cierta la presencia de gases volcánicos “reductores” tales como el amoníaco, el hidrógeno y el metano, al igual que el dióxido de carbono. Por lo tanto, las condiciones sobre la superficie terrestre podrían haber sido parecidas a aquellas cerca de los respiraderos hidrotermales, y es posible entonces, tal como lo sugiriera Darwin primeramente, que la vida haya surgido en los parajes vadosos descriptos. Con volcanes en erupción, relampagueo incesante, y radiación extrema a través de una delgada y pútrida atmósfera, la tierra primitiva era difícilmente una escena bucólica; se parecía más cercanamente al concepto medieval de infierno.

Existe un acuerdo general de que las formas de vida originales, las denominadas protocélulas o protobiontes, debieron haber sido geles –manchas de polímero hidratado que quedaron diferenciados de su ambiente acuoso. La evidencia de semejante condensación acumulativa fue producida casi un siglo atrás cuando Bungenberg de Jong (1932) mostró que incluso soluciones diluidas de polímeros, cuando se agitaban, se fusionaban en gotitas –entonces denominadas coacervados - en los cuales la materia orgánica se tornaba altamente concentrada. La concentración polimérica en tales gotitas podía exceder la concentración en el baño circundante tanto como hasta en 10.000 veces. Cuando se las ponía en ciertas tinturas, las gotitas se tornaban progresivamente más coloreadas, con intensidad a menudo excediendo muchas veces a la de la solución circundante. Por ende, las gotitas de gel tenían la capacidad de concentrar ciertos solutos, tal como la célula concentra potasio.

Aquellas observaciones dieron crédito a la emergente visión de que el protobionte podría haber sido un simple gel de polímero. Pero no confrontaron la naturaleza de los polímeros –el hecho de que, por ejemplo, los polímeros podrían haber sido construidos a partir de aminoácidos. Este interrogante fue considerado en experimentos clásicos por Stanley Miller y Harold Urey en los años 1950, los cuales demostraron que bajo condiciones medioambientales como las que se pensaba que existieron en la naciente tierra, aminoácidos pudieron haberse creado abióticamente (Fig. 15.2); no se requería ninguna célula.



Figura 15.2. Demostración de que es posible crear aminoácidos bajo condiciones medioambientales como las que se pensaba que existieron en la primitiva tierra. El siguiente procedimiento podría lograr el truco: poner sales inorgánicas en un frasco; aplicar calor; coleccionar el vapor e infundir una mezcla de hidrógeno, nitrógeno y metano; descargar chispas eléctricas dentro de este gas para simular relampagueos; condensar los gases a una temperatura menor, y ¡voilà! –una mezcla de más de una docena de aminoácidos.

Por ende, los geles pre-celulares bien podrían haber contenido polímeros parecidos a proteínas.

La cuestión de si tales aminoácidos y/o otros solutos orgánicos podrían polimerizarse y gelificar depende de la concentración y del ambiente. En ambos cómputos, los estuarios son particularmente oportunos. Se sabe que las superficies de arcilla en estuarios promueven la polimerización –sus superficies se hallan a menudo repletas de fósiles procarióticos. Los estuarios también

concentran materia orgánica. Los geles y otras formas de materia orgánica frecuentemente se concentran más sobre la superficie del agua que en el volumen, tal como es evidenciado por las espumas de gel que se ven cubriendo **humedades** de sal y vados de estuarios. Las concentraciones aumentan aun más a medida que las olas rompen sobre las costas y dejan su residuo. Por lo tanto, los estuarios deberían estar maduros, incluso hoy en día, para la emergencia de protobiontes simples. Nada mágico es requerido.

El más antiguo de estos protobiontes no podría haber evolucionado de forma direccional alguna hasta que la genética ingresara al panorama. Los protobiontes ciertamente podían crecer –pudieron hacerlo a través de su fortalecimiento con otros protobiontes o mediante la absorción de materia orgánica. Y pudieron asimismo abrirse paso ante las afrentas ambientales. Pero es muy probable que en tales dinámicas primara el desorden hasta el momento en que la genética primitiva emergió, y según algunos, esto ocurrió tempranamente con ácidos nucleicos simples disueltos en el mar. Con la genética primitiva, la evolución pudo arrogarse alguna memoria, y por ende, direccionalidad. Las características más críticas para la supervivencia pudieron perpetuarse.

Entre las características críticas para la supervivencia, una de las más centrales debe ser el abastecimiento de energía. El aseguramiento de nutrimento adecuado es una lucha que persiste hasta hoy en día, y las luchas de la vida temprana no debieron ser muy diferentes. Lo que difería era la complejidad de las tareas. La principal –quizás única- tarea del protobionte era la de perdurar. Haciendo frente a la inexorable proclividad de la naturaleza hacia el desorden, un protobionte desprovisto de un abastecimiento de energía se dispararía tarde o temprano. No hay vuelta que darle: la entropía es la flecha del tiempo. El mantenimiento del orden requiere energía. Incluso para los protobiontes, la supervivencia dependía de un abastecimiento de energía.

La energía para el ordenamiento provenía (tal como lo hace hoy) del sol. Era derivada a partir de fuentes medioambientales tales como calor, mareas, olas, relámpagos, y evaporación. La evaporación inducida por el sol, por ejemplo, pudo concentrar solutos, cambiando el equilibrio hacia la polimerización y por ende promoviendo el orden. Pero tales fuentes de energía se hallaban completamente fuera del control por parte del protobionte. La supervivencia dependía de los caprichos del ambiente. Aquellos protobiontes que pudiesen derivar energía de fuentes más confiables ciertamente habrían estado aventajados para sobrevivir.

ATP

Consideremos el ATP. Además de su ostentada capacidad para producir energía a través de la hidrólisis, dos características adicionales conspiran para hacer del ATP una fuente de energía particularmente fértil. Una es la alta concentración de carga. La cercana proximidad de sus tres fosfatos confiere a la molécula una concentración de carga negativa inusualmente alta, creando un punto focal de carga intensa. El segundo es la alta afinidad. La afinidad del ATP por la miosina, por ejemplo, es de 10^{11} hasta 10^{13} M^{-1} (Trentham *et al.*, 1976), lo cual implica que la asociación es prácticamente irreversible. El ATP en solución sería rápidamente absorbido y retenido por las superficies proteicas, las cuales entonces habrían adquirido focos de intensa carga negativa.

La manera exacta en la cual la energía libre es extraída de esta molécula para realizar un trabajo ha permanecido sorprendentemente indefinida, pero una vía potencialmente simple es la inducción de orden –dirigir proteínas contiguas hacia su estado extendido y el agua vecina hacia su estado estructurado. La noción de extensión proteica inducida por carga proviene a partir del clásico fenómeno de inducción, esbozado un siglo atrás por G. N. Lewis, y extendido a estructuras de mayor escala por Ling (1962). La hipótesis de asociación-inducción de Ling postula que ciertos ligandos pueden ejercer efectos de largo alcance –similares a los efectos alostéricos de reconocida ocurrencia en proteínas. Ligandos cargados tales como en particular el ATP desvían la nube de electrones del átomo adyacente, lo cual a su vez desvía la nube del átomo subsecuente, etc.

A través de semejante acción secuencial, el ligamiento del ATP induce una extensión proteica de largo alcance, la cual es luego reforzada por la estructuración del agua. El cambio de la longitud proteica será extensivo en proteínas negativamente cargadas porque el ATP también se halla negativamente cargado, induciendo localmente potentes fuerzas repulsivas que conducen la extensión.

Un ejemplo de semejante acción de larga distancia se da en la hemoglobina, la principal proteína de los glóbulos rojos sanguíneos que transporta oxígeno. La afinidad de la hemoglobina por el oxígeno es reducida dramáticamente por el ATP (Chanutin y Hermann, 1969; Klinger *et al.*, 1971). Esta acción resulta aparentemente sólo del ligamiento del ATP, porque la hemoglobina no hidroliza ATP. Sin embargo, el sitio de ligadura de ATP está alejado de los cuatro sitios de ligadura de oxígeno. Por ende, el efecto del ligamiento del ATP deberá propagarse mediante un mecanismo categorizado más generalmente como alostérico. Evidentemente, el ATP induce algún tipo de transición de fase cooperativa que abarca mucho o la totalidad de la molécula.

Otro ejemplo se da en el músculo. Sin ATP, el músculo se halla en un estado de *rigor-mortis*, en el cual las proteínas constituyentes están unidas entre sí mediante enlaces cruzados y contraídas. El ATP rompe los enlaces cruzados de actina-miosina y restaura las proteínas a su estado extendido. El sitio de ligadura del ATP está alejado de los sitios de enlazamiento cruzado y contracción, por lo que la influencia del ATP deberá ser nuevamente de larga distancia. El experimento del extremo cortado presentado en el Capítulo 6 implica que el estado del ATP es uno de alta energía potencial: cuando el músculo cortado es expuesto a soluciones salinas durante extensos períodos, solo aquellas regiones conteniendo ATP no hidrolizado muestran particionamiento iónico selectivo; las regiones desprovistas de ATP no lo hacen (Fig. 15.3). Por ende, el ATP dirige al sistema hacia su estado de energía potencial alto.

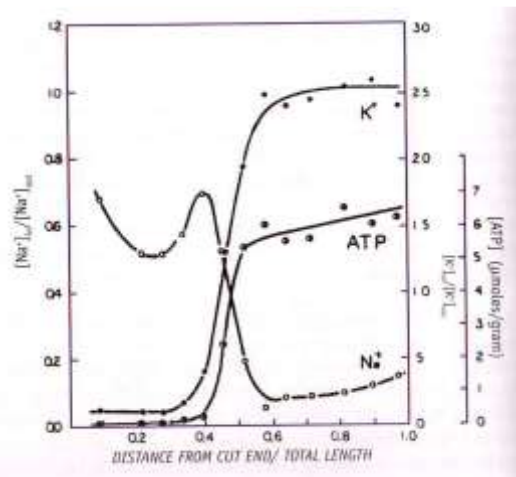


Figura 15.3. Efecto del ATP sobre concentraciones iónicas en experimento del extremo cortado (según Ling, 1992). Un músculo cortado fue expuesto a solución salina fisiológica a 25°C y examinado luego de tres días. El ATP fue deplecionado en la zona dañada cerca del corte (izquierda). En zonas más remotas (derecha), la alta concentración de ATP se correlaciona con la acumulación de potasio y la exclusión de sodio.

Estas acciones de largo alcance del ATP son tratadas en profundidad por Ling (1992), quien enfatiza al ligamiento *per se* como el evento de significancia primaria. Pese a que la hidrólisis ha sido el vehículo de abastecimiento energético aceptado, existe una creciente focalización en el ligamiento (*p.ej.*, Visscher *et al.*, 1999). Dado que el ligamiento del ATP es tan firme, la energía liberada es sustancial –alrededor del doble de la obtenida por hidrólisis.

Las acciones del ATP son mimetizadas hasta cierto grado por fosfatos orgánicos más simples. Se sabe que el ligamiento de fosfato induce muchos de los mismos procesos funcionales vinculados al ligamiento de ATP. Los fosfatos disueltos en la sopa primigenia podrían por ende haber precedido al ATP como una fuente de energía. Por el otro lado, el ATP mismo podría haber sido una notable adición en virtud de la magnitud de energía libre sustancialmente mayor que puede ser extraída como resultado de su afinidad proteica y concentración de carga mucho más altas.

La fuente inicial de ATP fue presumiblemente exógena. Bajo las condiciones atmosféricas prevalecientes en ese entonces, los experimentos han demostrado que el ATP puede ser creado abióticamente de manera casi igual a aquella en que pudieron crearse aminoácidos y ácidos nucleicos. Pero resulta poco plausible que semejantes fuentes abióticas pudiesen haber producido ATP en concentraciones muy altas, y eventualmente el protobionte desarrolló sus propios medios de producción. Incluso el nuevo vehículo endógeno debió haber sido de eficacia limitado, dado que todavía el oxígeno no se hallaba disponible en la atmósfera; las células tuvieron que apoyarse en procesos anaeróbicos de bajo rendimiento que son los precursores de la actual glucólisis. No obstante, la emergencia de la maquinaria productora de ATP endógena preparó el escenario para los principales desarrollos evolutivos que transformarían simples geles protobiontes en procariotas y, eventualmente, en eucariotas.

En resumen, el abastecimiento de energía para el protobionte provino en última instancia del sol. La energía solar produjo ATP –al principio abióticamente y más tarde mediante maquinaria biótica. La energía del ATP fue utilizada a su vez para conferir energía potencial, posiblemente a través de un mecanismo de extensión proteica / estructuración ácuca. Semejante energía ayudó a mantener estabilizado al sistema en su ordenado estado de alta energía potencial. Esencialmente, el ATP mantuvo “vivo” al sistema.

MITOCONDRIAS Y METABOLISMO AERÓBICO

El contorno de este paisaje energético fue dramáticamente alterado por el advenimiento del oxígeno atmosférico. Cuando las células primitivas comenzaron a liberar oxígeno fotosintético hacia la atmósfera, y en tanto la actividad volcánica se apaciguó, la atmósfera cambió: los gases reductores fueron reemplazados progresivamente por oxígeno. La respuesta a este embate sobre la regla ancestral fue un nuevo metabolismo capaz de capitalizar la presencia del oxígeno. Pese a que la vía anaeróbica ha permanecido en reserva para exigencias de privación de oxígeno, la ruta aeróbica surgió repentinamente en ciertos organismos unicelulares incluyendo las bacterias, y eventualmente sobrepasó en eficacia a la vía anaeróbica. Ahora los procariotas aeróbicos pudieron florecer. Se disponía de energía a raudales, no sólo para el mantenimiento del orden, sino también en apoyo del impulso hacia la especialización.

Pero algo ocurrido a lo largo del camino habría de convertirse en noticia. Debido a alguna argucia, una célula bacteriana primitiva que había empezado a emplear el nuevo sistema metabólico basado en el oxígeno, invadió a una célula mayor que no lo había hecho. El invasor permaneció –y allí empezó la historia de la mitocondria alojada dentro de la célula eucariota huésped. En base a la genómica y otras evidencias, es sabido que células bacterianas han evolucionado convirtiéndose en mitocondrias.

Dado que el ATP es producido sobre la superficie bacteriana, el invasor debe haber estado forrado con ATP, y por ende con una carga negativa. Para la célula hospedera, la internalización debió por ende haber sido una experiencia discordante. Pero el anfitrión convirtió esta displacentera desventura en ventaja: la alta carga de superficie del invasor pudo ordenar el agua de la célula hospedera del mismo modo en que las superficies cargadas ordinariamente ordenan el agua (Capítulo 4); y el ordenamiento del agua pudo inducir la extensión de proteínas cercanas de la célula hospedera. En tanto el oxígeno pudiera difundir a través de la célula hospedera para propulsar una continua producción de ATP, el invasor podría ser explotado para conferir energía potencial al anfitrión (Fig. 15.4).

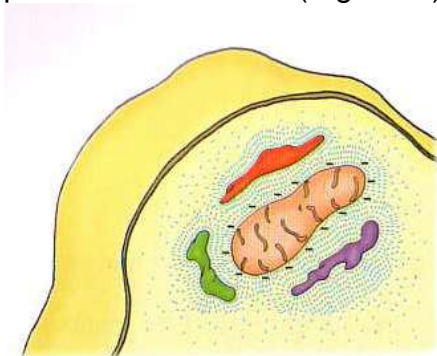


Figura 15.4. La carga de superficie en la célula bacteriana internalizada organiza el agua de la célula anfitriona y extiende sus proteínas.

La existencia de semejante escenario regularizador es apoyada por el hecho de que el agua dentro y alrededor de las mitocondrias parece hallarse estructurada. La estructuración del agua dentro de la mitocondria está confirmada por estudios con RMN (López-Beltrán *et al.*, 1996). Y zonas inmediatamente por fuera de las mitocondrias a menudo contienen amplias zonas despejadas (Fig. 15.5), implicando agua libre de solutos. Por lo tanto, la carga de superficie mitocondrial, continuamente recargada por la síntesis de ATP, podría estructurar el agua vecinal; y el agua estructurada podría, a su

vez, conducir a las proteínas cercanas hacia su estado extendido, de alta energía potencial. Esto promovería y sostendría el orden.



Figura 15.5. Muestras rápidamente congeladas de músculo de sapo, ilustrando extensas zonas “limpias” (claras) alrededor de mitocondrias (ovaladas). De Trombitás *et al.*, 1993.

Los mecanismos de ordenamiento de superficie no son exclusivos de la biología. En el campo de la ciencia de materiales, por ejemplo, la “energía de superficie” es un vehículo ampliamente reconocido por su impacto sobre las moléculas de solvente vecinas, las cuales pueden ser transformadas para realizar un trabajo (por ejemplo, figura 11.12). Lo mismo es aplicable a un tubo capilar, donde la interacción de superficie puede conducir una columna de fluido en sentido ascendente hasta alturas considerables. El escenario propuesto aquí es en gran parte el mismo, excepto que una fuente de energía más fundamental mantiene la condición de la superficie de modo tal que la energía puede continuar siendo abastecida.

El desplazamiento del sitio de ordenamiento desde la superficie de la célula hacia la superficie mitocondrial debió haber cambiado la ecuación de la vida – porque las mitocondrias ahora podrían evolucionar sencillamente hacia intensificar la producción de energía. Y efectivamente esto fue lo que hicieron. La tasa de producción de energía fue acrecentada a través del desarrollo de invaginaciones denominadas crestas, las cuales agrandaron el área de superficie productiva; y las mitocondrias también se multiplicaron en cantidad, y hábilmente se posicionaron a sí mismas cerca de los consumidores de energía más prodigiosos, tales como los axonemas y miofibrillas. Con las mitocondrias crecientemente eficaces en el abastecimiento de energía, las células anfitrionas pudieron solventar el viraje de su atención hacia otros desarrollos tales como la especialización. La tarea de energizar fue dejada en manos de la mitocondria – el huésped que se quedó.

CICLO DEL ATP Y CARGA

El escenario arriba descrito implica un efecto similar a la forma en que se produce el ordenamiento de limaduras de hierro por el influjo de un imán. Para las tempranas células anfitrionas, semejante acción de larga distancia bien podría haber sido un mecanismo energético de alguna significancia. Pero el ATP no quedó encerrado en la superficie del invasor indefinidamente –es conocida la translocación del ATP mitocondrial hacia las proteínas celulares. Una vez adosado allí, es disgregado en ADP y fosfato (Pi), los cuales vuelven a translocar hacia las mitocondrias para ser reciclados hacia ATP. Este mecanismo de transporte de ida y vuelta evidentemente suplantó, o al menos incrementó, al mecanismo de abastecimiento energético remoto.

A pesar de eso, el principio de extracción de energía pudo permanecer bastante similar al recién descrito –la extensión de proteínas inducida por ATP, con la consecuente estructuración del agua vecina. La energía liberada a medida que el ATP se adosa a la proteína conduciría al complejo proteína-agua hacia su estado ordenado de alta energía potencial, mientras el ATP es

hidrolizado hacia ADP y P para su reciclaje. La diferencia es que la fuente del ATP es ahora endógena y más amplia; y la acción es local. Por tanto, el mecanismo de transporte de ida y vuelta puede ser considerado un avance respecto del mecanismo indirecto, más remoto.

La funcionalidad de semejante mecanismo de ordenamiento en base a proteína depende de la capacidad del ATP de traslocar desde las mitocondrias hacia las proteínas, y esto debiera ser posible durante la actividad de las organelas (Fig. 15.6). Durante este tiempo, el agua vecinal se desestructura, lo cual significa que la difusión en sentido descendiente a lo largo de gradientes de concentración es posible. El ATP mitocondrialmente generado difundirá por ende hacia las organelas cercanas –donde fácilmente reemplaza al ADP en virtud de su afinidad por proteínas 100.000 veces más alta (Lowey y Luck, 1969; Marsh *et al.*, 1977). El ADP liberado puede difundir descendientemente por su gradiente de concentración y en retorno hacia las mitocondrias, para la recarga hacia ATP. Todos estos intercambios suceden mientras la organela actúa. La recarga es por ende veloz, si no inmediata.

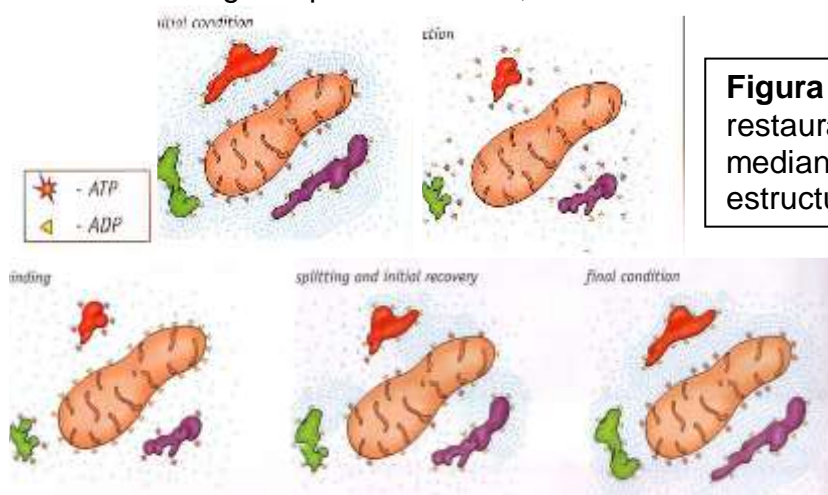


Figura 15.6. Ciclaje del ATP y restauración de la energía mediante extensión proteica y estructuración acuosa.

El mecanismo de energización del ATP recién descrito comparte muchas características con la fosforilación –un mecanismo universal para la activación proteica. En ambos escenarios, el fosfato sumado es el mediador de un cambio de la conformación proteica. El primero es facilitado por enzimas (ATPasa) que pueden formar parte de la proteína misma, mientras que el último es facilitado por enzimas (quinasa) que son a menudo entidades diferentes. De cualquier manera, estos dos vehículos para la activación proteica parecen operar bastante similarmente.

Una característica notable del mecanismo de ciclaje del ATP es el ciclaje concomitante de la carga. Con cada ATP que es adosado, la proteína gana en carga negativa. Dado que la carga no puede asociarse indefinidamente, la proteína deberá eventualmente descargarse, y esto sucede mientras los productos hidrolíticos ADP y P se disocian, retornando a la proteína a su estado descargado. La proteína es entonces cargada para impartir energía potencial, y descargada durante la acción. En virtud del requerimiento de carga, no es en absoluto sorprendente el hecho de una cadena de transporte de electrones sea utilizada para la generación de ATP. Los electrones son transferidos a lo largo de esta cadena en etapas, en última instancia para la síntesis de ATP negativamente cargado –cuya carga es luego transferida a la proteína. La proteína es literalmente “cargada” con energía.

El continuo flujo de carga hace que el proceso de abastecimiento energético se parezca bastante al de una batería. La batería mitocondrial (obteniendo su energía a través del metabolismo), provee carga a la matriz citoplasmática, la cual utiliza la carga para aprontarse para el trabajo. El sistema opera de forma muy similar a la de una computadora portátil o un taladro inalámbrico, los cuales requieren una recarga previamente a cada uso. Nuevamente, el sistema mecánico y el sistema natural operan en gran manera mediante el mismo principio.

CONCLUSIÓN

A partir de estas consideraciones deviene una hipótesis energética central –la energía para la acción celular surge en última instancia de la carga. La carga puede residir en la superficie mitocondrial o en la superficie de la proteína: la carga sobre la superficie mitocondrial ordena el agua vecina, lo cual conduce a las proteínas hacia su estado extendido; la carga sobre la superficie proteica extiende a la proteína, lo cual ordena el agua vecina. De ambas formas la matriz de proteína-agua gana en energía potencial.

Esta energía potencial puede ser utilizada para realizar trabajo, el cual es entregado durante la transición de fase. El sistema se comporta casi como una hilera de fichas de dominó: la energía debe ser invertida primeramente para ordenar las fichas (agua), antes de poder ser derribada con el golpe ligero de un dedo. Los dominós que caen pueden realizar trabajo mientras la entropía del sistema aumenta.

La explicación detallada de la transferencia de energía en este proceso de dos etapas es compleja. Entre los diversos factores cuantitativos que necesitan ser considerados se hallan: la separación decreciente de carga mientras el ATP se acerca a un sitio opuestamente cargado; el decremento de la entropía mientras el ATP es adosado e inmovilizado; el cambio de la energía de hidratación proteica; la hidrólisis del ATP; la eficacia del proceso... La lista continúa.

De repetirse el proceso, sin embargo, el principio de conservación de la energía viene al rescate. Al final, los únicos ingresos en la larga lista de transacciones energéticas que no cancel out son: (a) la partición del ATP (~ 7kCal/mol); y (b) el calor liberado por el proceso (eficiencia de < 100%).

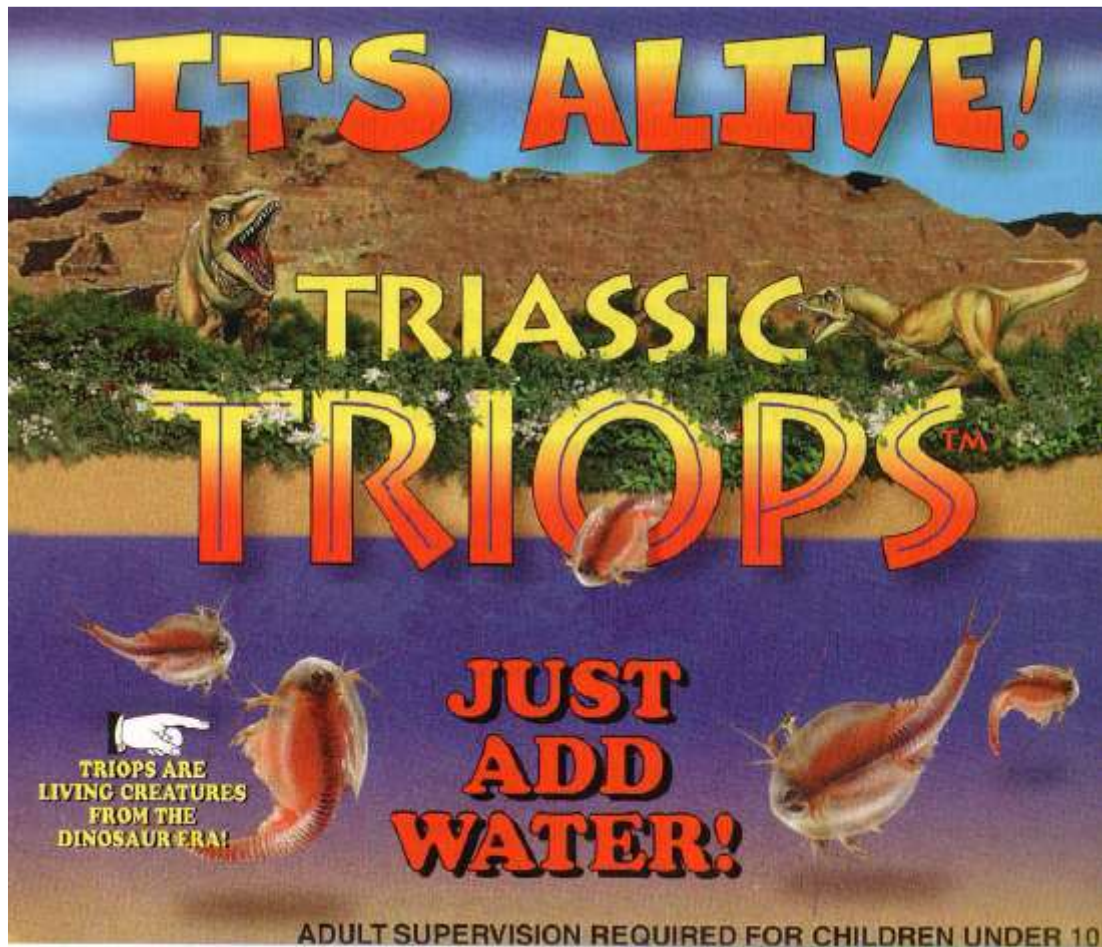
Por ende, una cap puede ser especificada sobre la magnitud de energía disponible por molécula de ATP que puede ser convertida hacia el ordenamiento, y subsecuentemente para el trabajo.

Este proceso cíclico puede ser trazado en la figura 15.6. Con el disparo de la acción (segundo panel), moléculas de ATP de las mitocondrias se adosan a proteína (panel medio). El rol principal de la proteína es transducir energía metabólica hacia estructura ácuca –el “montaje de los dominós”. Por ende, el adosamiento y la partición del ATP inducen la conformación proteica extendida (último panel), lo cual promueve la estructuración del agua al ritmo de unas pocas kCal por mol de ATP. El sistema ahora es cebado (panel superior). Luego los dominós son acometidos hacia la acción, y el incremento en la entropía es utilizado para la realización de trabajo.

Algunas características del mecanismo energético propuesto condicen con los mecanismos de los libros de texto, mientras que otros no lo hacen. Según los puntos de vista vigentes, la moneda del abastecimiento de energía es la

misma, el ATP. Es sabido que el ATP actúa directamente sobre las proteínas, ligándose e hidrolizándose hacia ADP y P y consecuentemente aportando energía. Aquí, el mecanismo de abastecimiento energético del ATP obtiene especificidad –el ordenamiento de agua y la extensión de proteínas. El mecanismo enfatiza el restablecimiento de energía potencial por delante del tiempo; y enfatiza el mantenimiento de la energía potencial a través de un paso intermedio en el cual el ATP de la superficie mitocondrial promueve el ordenamiento acuoso para asegurar el que las organelas yuxtapuestas estén equilibradas para su próximo acto.

En tal sentido, la célula se parece muchísimo a una máquina de entropía, preparándose para la acción a través de la construcción y el mantenimiento de orden, y luego liberando energía mediante el desordenamiento. Esto no pretende sugerir que la entalpía no juega rol alguno; la energía libre es obviamente derivada a partir de alguna combinación de contribuciones entálpicas y antrópicas. Pero la entropía ha sido ampliamente ignorada en el pasado, y este es el motivo por el que es enfatizada aquí. El hecho de que las células sean entidades de un orden exquisito no es para nada fortuito. Refleja una enorme capacidad para el almacenamiento de energía –una característica que podría ser vital para la vida.



Disponible en los comercios locales. Rehidratar para obtener mascotas.

CAPÍTULO 16: UN NUEVO PARADIGMA PARA LA FUNCIÓN CELULAR

Al acercarse nuestro viaje exploratorio a una conclusión, parece oportuno dar un paso hacia atrás y reflexionar, ya que el enfoque orientado a metas que hemos tomado nos ha dejado poco tiempo para tomar en cuenta los aspectos más amplios del cuadro. Esto es algo bastante parecido a la vida misma. Como Mitch Albom relata en su clásico libro *Los Martes con Morrie*, raramente surgen oportunidades en nuestras vidas orientadas hacia metas para reflexionar sobre lo que realmente importa –sólo cuando se avecina el final, a menudo emergen las perspectivas más significativas.

Entonces ahora reflexionamos sobre lo que los capítulos de este libro han llevado implícito. Consideramos los temas que se integran, así como también los temas que se proyectan más allá del edificio funcional que hemos construido.

CIMIENTOS

Nuestra atención fue deslumbrada por la anomalía. El saber actual anticipa que las brechas en la integridad de la membrana celular deberían incapacitar a la célula pero una diversidad de observaciones implicó lo contrario: la célula pudo sobrevivir incluso a una disrupción física grave, sin mencionar evidencias en al menos varios casos de que la membrana no se reselló. La integridad de la barrera pareció inexplicablemente carente de importancia.

Llegamos a darnos cuenta de que el concepto de barrera se había basado en la visión de que el citoplasma era una solución acuosa. Se necesitaba una barrera para impedir que los contenidos celulares filtraran hacia el exterior. Los científicos celulares ahora reconocen que el citoplasma no es para nada una solución acuosa sino una poblada matriz polimérica que puede mantenerse unida incluso cuando la membrana celular ha sido quitada. Pero la visión del siglo XIX engendró mecanismos que perduran hasta el día de hoy –la difusión libre, por ejemplo, perdura como el presumido motor de los desplazamientos de solutos, pese a las evidencias de que los solutos en las células en reposo se hallan en gran parte adsorbidos. Esta persistente afinidad por la tradición termina imponiendo el precio de la redundancia innecesaria –una barrera envolvente para impedir la disipación de la masa, y canales y bombas para mediar los flujos a través de la barrera.

Estos no son requeridos en un citoplasma gelatinoso. Las matrices de los geles retienen solutos y agua sin una barrera envolvente; y sin una barrera no hay necesidad de que permeen la barrera canales o bombas iónicos específicos. También es debatible el tema de rebanar la célula: rebanar la célula debería ser tan inocuo como rebanar un gel.

El tratamiento de la célula como un gel estableció nuevas reglas de base para los solutos y el agua. El agua del gel es adsorbida sobre las superficies poliméricas. La adsorción imparte orden y el agua ordenada no es hospitalaria para muchos solutos, los cuales residen preferentemente en las interfases entre agua y polímeros. Tanto en los geles como en las células, hallamos

evidencia considerable respecto de que los solutos estaban asociados a las superficies poliméricas / proteicas, y en gran parte excluidos del agua.

Estos rasgos físicos y químicos condujeron hacia una explicación directa del particionamiento fisiológico de iones (Fig. 16.1). El particionamiento de un soluto depende de la solubilidad relativa en el agua suelta vs. estructurada, y de la afinidad con la superficie proteica. Ambas dependen del tamaño de la cubierta de hidratación del ión. Cuanto más grande la cubierta, más baja la solubilidad; cuanto más grande la cubierta, es mayor la energía necesaria para remover la cubierta para la asociación con la superficie. La cubierta del sodio relativamente grande implicó su exclusión sustancial del citoplasma y su limitada afinidad por las proteínas. La cubierta más pequeña del potasio implicó su más alta solubilidad y su más alta afinidad. Por lo tanto, el particionamiento de los iones esenciales de la célula se pudo explicar directamente, sin necesidad de invocar mecanismos de mantenimiento consumidores de energía.

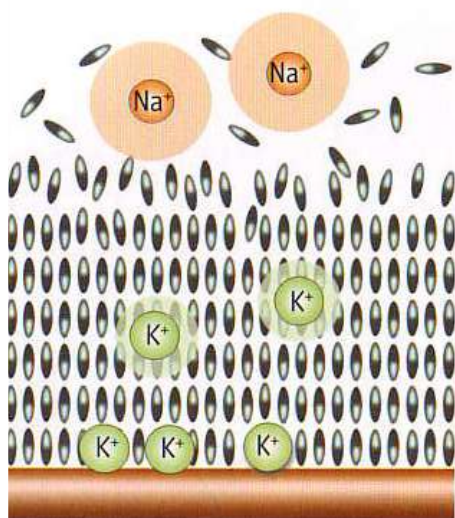


Figura 16.1. El tamaño del ión hidratado es un determinante crítico de la solubilidad en agua estructurada y de la afinidad por superficies proteicas.

La solvencia limitada del agua estructurada también ayudó a explicar el potencial eléctrico. Dado que los iones no pueden penetrar libremente el medioambiente acuoso de la célula, su concentración intracelular es limitada. Los cationes no pueden contribuir con suficiente carga positiva para equilibrar la carga negativa que portan las proteínas intracelulares –particularmente las proteínas alta y negativamente cargadas del citoesqueleto periférico. De este modo, la célula queda negativamente cargada, y, correspondientemente, su potencial es negativo.

A esta altura, parecía que el concepto del gel era prometedor: podía sortear la anomalía de la brecha en la membrana; parecía explicar el particionamiento iónico; y podía rendir cuentas sobre los potenciales celulares –siendo los dos últimos rasgos rudimentos de la fisiología celular. Por el otro lado, estos rasgos son estáticos. Para el ejercicio ulterior del paradigma del gel, parecía importante determinar si un mecanismo basado en el gel también poseía el potencial para explicar las tareas dinámicas de la célula.

Para hacer esto, dirigimos la mirada hacia los geles sintéticos. Observamos que un denominador común de la acción del gel era la transición de fase. Las transiciones de fase logran maravillas en los geles de polímeros: desplazan solutos, separan fases, cambian volúmenes, propulsan iones, etc. –acciones sospechosamente similares a aquellas pertinentes a la célula. Es más, tales acciones son generadas por disparadores medioambientales relevantes: estos incluyen cambios en el pH, temperatura, presión, contenido iónico, etc. –

estímulos a los cuales la célula está expuesta regularmente. Por lo tanto, el denominador común de la acción del gel parecía tener un potencial como denominador común de la acción del gel.

La hipótesis del denominador común fue investigada en la segunda mitad del libro mientras exploramos la dinámica de diversas organelas. A pesar de la inevitable complejidad biológica –cada uno de los 100.000 productos del genoma humano debe servir a alguna función- la simple transición de fase podría contribuir en gran medida a explicar el funcionamiento esencial de cada una de las organelas de la célula. Las explicaciones no eran enteramente nuevas: en varias instancias la relevancia de la transición de fase había sido reconocida anteriormente y perseguida obstinadamente. El nuevo mensaje es que la transición de fase podría ser genérica: podría ser el hilo en común que teje la trama de la función celular.

Habiendo recapitulado el mensaje central del libro, ahora reflexionamos sobre varios de sus temas emergentes con miras hacia una comprensión más profunda y una relevancia más amplia.

AGUA ESTRUCTURADA

Para los biólogos entrenados tradicionalmente, el tópico más discordante entre los que toca el libro podría ser el del agua estructurada. La presencia de una a dos capas de agua estructurada alrededor de las proteínas es reconocida en términos generales, pero el potencial para la multi-estratificación es menos apreciado, incluso pese a que el concepto ya había sido alguna vez tema de vigoroso debate entre los científicos de la célula. Con el citoplasma tan atestado de macromoléculas como se sabe hoy que lo está, serían suficientes, en promedio, menos de diez capas para abarcar toda el agua de la célula. Algunas estimaciones sugieren sólo cinco o seis capas. Presentamos la evidencia sobre la estructuración del agua respecto de ambos geles y células, y le queda al lector la tarea de juzgar si esta evidencia es convincente o no.

Si el agua dentro de la célula está estructurada, el agua fuera de la célula –e incluso la no relacionada con la célula- podría hallarse estructurada también. Después de todo, las superficies que organizan el agua no son exclusivas del citoplasma. Cualquier sistema conteniendo superficies hidrofílicas estrechamente abarrotadas podría contener agua estructurada, y la significancia funcional de tal agua podría ser tan profunda como se lo argumentara respecto de la célula. Existen muchos sistemas como este.

Consideren el árbol, por ejemplo. Las raíces del árbol absorben el agua del suelo, la cual es transportada hacia arriba para sustentar el crecimiento y reponer la pérdida de humedad a través de la evaporación. El conducto de transporte es un tubo verticalmente orientado denominado xilema. El agua es atraída hacia arriba a través del xilema por algún tipo de fuerza de la cual se piensa que involucra una atracción osmótica y/o una acción capilar. Para árboles de una altura razonable estos mecanismos son suficientes, pero se topan con una dificultad al intentar explicar cómo puede elevarse el agua hasta los 100 metros de altura de un árbol de secuoya, ya que tales fuerzas de atracción deben trabajar en contra de una contra-fuerza formidable –la fuerza de la gravedad.

El que las fuerzas de capilaridad se hallen involucradas parece estar más allá de toda duda. El tubo del xilema posee una importante afinidad por el agua, y puede arrastrar agua hacia arriba mediante la misma fuerza de afinidad de superficie que empuja la sangre a través de un tubo capilar estrecho. Pero los tubos largos presentan un problema. Aún pese a que la fuerza de empuje hacia arriba pueda ser muy potente al estrecharse el tubo de xilema cerca de su parte superior, el peso de la columna de agua ostenta una enorme carga que podría conducir fácilmente a la rotura de la columna de agua, o a la cavitación. Esto se observa comúnmente (Canny, 1998). Con la cavitación, incluso una fuerza de atracción hercúlea será ineficaz –como lo descubre cualquier niño al sorber de una pajita con líquido conteniendo una burbuja de aire en el medio.

Sin embargo, el peso no constituiría problema alguno si la columna de agua se aferrara firmemente al tubo, y un indicio en esta línea fue anticipado hace algunos años (Plumb y Bridgman, 1972). El asunto es si podría pegarse toda el agua en el corte transversal del xilema. Para este fin, es sabido ahora que el tubo del xilema está conformado por una matriz fibrosa que se extiende hacia el lumen (Fig. 16.2). El material de la matriz es un mucopolisacárido extremadamente hidrofílico, y se dice que el fluido del xilema asociado es viscoso (Zimmermann *et al.*, 1994). Por lo tanto, la matriz aparentemente nuclea un gel que bien podría abarcar la sección transversal de la columna por entero. Si el agua se aferra a la matriz, el peso de la columna es irrelevante: Mientras que haya suficiente fuerza adhesiva, un tubo suficientemente largo podría enviar agua hasta la luna.



Figura 16.2. El tubo del xilema consiste en una matriz fibrosa penetrando hacia el lumen. El agarre del agua puede crear un gel.

El hecho de que la fuerza adhesiva es apreciable es sustanciado por la experiencia común. ¿Alguna vez intentaron hacer fuego con un tronco recientemente cortado? En Seattle, la penumbra del húmedo invierno sumada a una fuente de madera dispuesta inspira una habitual actividad de fogata. La madera estacionada quema bien, pero todos saben que la madera húmeda apenas chisporrotea. La sorpresa es que el estacionamiento puede requerir un año –incluso para troncos hachados. El agua se aferra tenazmente. Semejante tenacidad no se ve en troncos cuya estructura molecular se ha deteriorado por el transcurso del tiempo; la madera vieja vertida dentro de un tacho de agua hasta saturarse se secará en corto plazo y quemará bien. Por lo tanto, la fuerza adsorptiva del agua yace en el diseño de las superficies de la naturaleza. La fuerza es suficientemente potente como para resistir todo intento de deshidratación que no sea fanático, y aparentemente tan fuerte como para elevar fácilmente el agua hasta la copa de una altísima secuoya (Fig. 16.3).



Figura 16.3. El agua del suelo absorbida por las raíces del árbol se abre camino hasta la copa, incluso en secuoyas de 100 metros de altura.

El agua estructurada también podría tener un rol en la esfera geofísica, y con el riesgo de fomentar la especulación más allá de los límites razonables de este libro, me gustaría sugerir dos ámbitos pertenecientes a ella: la tierra y el cielo. En la tierra, la proporción entre sodio y potasio es variablemente alta, mientras que en el mar es de sólo 1:50. ¿Por qué una inversión semejante? En parte, el paradigma del alto potasio / bajo sodio en la tierra surge a partir del contenido mineral particular de la roca cortical. Pero los rasgos de adsorción acuosa podrían también hacer su aporte. Si el agua adsorbida a las superficies de la arcilla hidrofílica de la tierra se halla estructurada por las cargas de superficies, acumulará potasio y excluirá al sodio. En el esquisto, por ejemplo, la proporción potasio / sodio de la superficie es de 3:1 a 4:1 (Krauskopf, 1967). El sodio excluido sería entonces lavado hacia el mar, acumulándose allí en alta concentración. La tierra podría de este modo ser un macrocosmos del citoplasma –rodeada por un mar de sodio excluido.

Luego consideremos al cielo. El cielo es el lugar donde se junta la humedad ascendente. Pero tal humedad no se dispersa uniformemente; se condensa en fofas nubes blancas que flotan dentro de una masa de aire contrariamente seco. El por qué de su condensación en unidades discretas en vez de permanecer uniformemente dispersa es una de esas cuestiones aparentemente ingenuas que los geofísicos, por lo que yo sé, todavía deben enfrentar seriamente. El paradigma del agua estructurada podría mantener su relevancia nuevamente. Las partículas de polen o polvo cargadas serían capaces de reunir colecciones de agua orientada, como lo hacen otras macromoléculas. Si la superficie de la colección de agua retiene sobre la superficie del formador de núcleos alguna de las asimetrías de carga presentes, entonces el conjunto actúa como un dipolo. La atracción dipolo-dipolo conducirá inevitablemente a la formación de nubes de humedad.

Pese a que estas ideas son especulativas, no escapa a la razón el hecho de que el agua estructurada pudiese jugar un rol insospechadamente crucial en ámbitos que van mucho más allá de los de la biología celular. El agua estructurada podría merodear dondequiera que existan superficies hidrofílicas – y podría conllevar poderes interpretativos aún por descifrar.

BOMBAS, CANALES Y MEMBRANAS

Otro de los temas del libro es el relegamiento de apreciadas entidades funcionales a posiciones de importancia secundaria. Estas entidades incluyen a bombas, canales y barreras de membrana fosfolipídica. En el paradigma propuesto tales elementos no son centrales. Por el otro lado, parecen efectivamente existir en alguna forma, y su rol precisa ser abordado.

La imagen que ha evolucionado se parece a esto (Fig. 16.4). El citoplasma está envuelto por una barrera multi-estratificada. La capa más íntima es el citoesqueleto periférico –una gruesa matriz densamente abarrotada de filamentos altamente aniónicos conteniendo elementos globulares sobresalientes. La próxima capa es la membrana fosfolipídica. Esta membrana también está tachonada de abundantes elementos incluyendo receptores, “bombas”, “canales” y otras moléculas que pueden sobresalir desde la célula. La membrana es por ende discontinua. Una barrera terciaria frecuentemente hallada en células eucarióticas es el glucocálix –diversamente descrito como un amortiguador mecánico-químico, un facilitador de la adhesión, y un agente del reconocimiento celular. El glucocálix es la cubierta de azúcar de la célula, conformado por una gruesa capa de moléculas con un contenido de azúcar tales como las glicoproteínas, los proteoglicanos y glucolípidos, algunas de los cuales pueden penetrar hacia atrás dentro de la bicapa de lípidos o incluso del citoesqueleto.

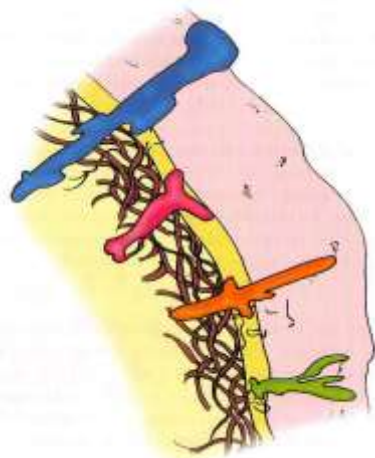


Figura 16.4. El citoplasma está rodeado por una frontera multi-estratificada que está salpicada por elementos protruyentes.

Claramente, entonces, el citoplasma está envuelto por una barrera multi-estratificada. Pero la barrera está atravesada por una colección de moléculas cuyas hendiduras proveen callejones para el flujo interior-exterior. Tales senderos podrían concebirse inexactamente como “canales”, abriéndose sus compuertas mediante la transición de fase. Podrían exhibir los tipos de sensibilidades farmacológicas observables, dependiendo de la naturaleza de la molécula específica atravesante. Por lo tanto, los senderos se comportan de forma bastante semejante a la concebida actualmente para los canales, pero son más grandes, más difusos, y no necesariamente exclusivos para un soluto particular.

En el nuevo constructo también se hacen notar los elementos análogos a bombas. Las bombas son definidas farmacológicamente: cuando un gradiente iónico transmembrana es afectado por una droga, se dice que la molécula destinataria a la cual se liga la droga es una bomba para ese ión. Por ejemplo,

la ouabaína se liga a una proteína superficial denominada ATP-asa de Na/K. Los gradientes de los iones de sodio y potasio son comprometidos por esta droga, por lo que la ouabaína es interpretada como un bloqueador de la bomba de Na/K.

Las interpretaciones como estas, sin embargo, no cuadran con la observación experimental. En el caso de la ouabaína, los gradientes iónicos son afectados no sólo en células intactas, sino también en células trozadas (Ling, 1973, 1978), donde las bombas no pueden constituir una fuerza capital. Una posibilidad alternativa es que la ligadura de la ouabaína induzca una transición que permita al sodio y al potasio fluir en descenso por sus respectivos gradientes de concentración. Claramente, el impacto de la ligadura a la ATP-asa Na/K se extiende afectando no sólo a la membrana: la ligadura de la ouabaína a células permeabilizadas impacta sobre procesos tan alejados como los microtúbulos citoesqueléticos (Alonso *et al.*, 1998) y el núcleo celular (Mentré y Debey, 1999). Por lo tanto, el impacto es global. No obstante ello, el impacto sí influye en última instancia sobre los gradientes iónicos. Mientras que evidentemente esto no constituye una prueba de que la ATP-asa Na/K necesariamente “bombea” alguna cosa, la conceptualización del proceso dentro del marco del bombeo podría continuar siendo un recurso conveniente siempre que la realidad subyacente se tenga presente.

Finalmente, la membrana. En la discusión sobre el desarrollo evolutivo del capítulo previo, un rasgo notable fue la ausencia de cualquier requisito de membrana específico. La célula comenzó como un gel polimérico y evolucionó a partir de allí. La supervivencia no dependió en ninguna etapa de la presencia de una membrana. Sin embargo, las membranas eventualmente sí aparecieron y uno podría con toda razón preguntar por qué. Si no eran imprescindibles, ¿para qué tomarse la molestia?

Un motivo plausible podría ser el de restringir el intercambio (Fig. 16.5). Los solutos pueden fluir uniformemente a través del límite de un gel ordinario. Con un bloqueo parcial mediante una membrana superficial, el flujo se restringirá a aquellas regiones carentes de membrana –regiones comúnmente ocupadas por receptores y otras proteínas. Si tales proteínas son activadas por iones y/u otros ligandos, entonces la forma más efectiva para su activación es “canalizar” hasta esos sitios los solutos requeridos.

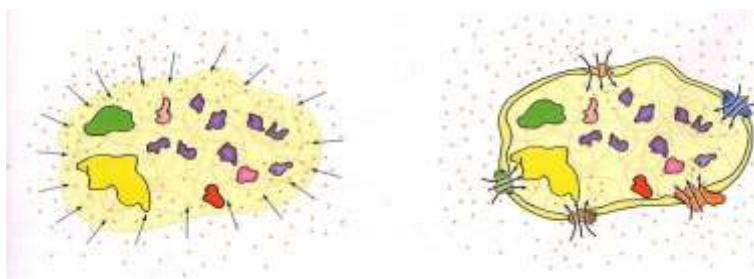


Figura 16.5. En relación a la ausencia de barrera (izquierda), una barrera parcial (derecha) restringe el intercambio de solutos.

Por lo tanto, la membrana puede haber surgido como una cuestión de eficiencia –para realzar la sensibilidad de la activación. Al mismo tiempo, la presencia de una membrana podría ayudar a refrenar la inevitable pérdida de solutos intracelulares críticos tales como el ATP. En este escenario cobra algo de sentido el progresivo incremento evolutivo de la cobertura por una bicapa lipídica (Capítulo 2).

Pero aparentemente, nunca se requirió una membrana que envolviera por completo a la célula, y debido a ello, la célula nunca necesitó hacer la abrupta transición desde un sistema sin barrera alguna hasta uno con una barrera. Semejante transición no pudo ocurrir de forma simple. La mediación del intercambio de soluto a través de la nueva barrera requeriría la aparición simultánea de canales y de bombas (o sus equivalentes), como asimismo de la maquinaria a través de la cual estos elementos pudiesen ser elaborados. Todo esto necesitaría haber aparecido contemporáneamente con la barrera, ya que no existía presión alguna por crearlos de antemano. El interrogante de la complejidad repentina es un obstáculo formidable el cual, afortunadamente, no precisa ser encarado en el paradigma en curso.

En suma, el nuevo paradigma contiene elementos holgadamente parecidos a los clásicos, y por eso no resulta sorpresa alguna el que tales elementos puedan ser aislados para su estudio. Por el otro lado, los roles de estos elementos pueden ser menos específicos y menos principales que lo generalmente previsto.

TRANSICIONES DE FASE

Un tercer tema del paradigma es la dominancia de la transición de fase. La transición de fase es propuesta como un mediador principal de la función celular, operando en diversas apariencias por todas partes de la célula. Aquí exploramos los atributos comunes de estas transiciones.

Para muchos biólogos, las transiciones de fase se hallan dentro del ámbito de un territorio desconocido. Los cambios conformacionales, en contraste, son ampliamente reconocidos, y surge la cuestión de si realmente los dos difieren de forma sustancial. El cambio conformacional implica alguna modificación en la estructura secundaria o terciaria de una proteína. El cambio de fase puede involucrar una modificación similar, pero típicamente involucra a un conjunto de moléculas en vez de sólo a una –de allí el prefijo “cooperativa” que antecede comúnmente a “transición de fase”. La diferencia, entonces, podría ser simplemente una de escala.

Un buen ejemplo de este paralelo puede hallarse en la dinámica del músculo, donde se observan pasos de traslación tanto en moléculas individuales como asimismo en conjuntos moleculares. Cuando la molécula de miosina individual se traslada a lo largo de un filamento de actina, el peldaño de desplazamiento es atribuido al cambio conformacional proteico (Kitamura *et al.*, 1999). Es casi seguro que estos pasos de traslación surgen de la misma fuente, porque en ambas instancias su dimensión es un múltiplo íntegro del espaciamiento del monómero de actina, un rasgo demasiado análogo a una firma como para presentarse fortuitamente. La diferencia, entonces, es en gran parte una de escala.

Al igual que el cambio conformacional, la transición de fase puede presentarse en muchas variedades. Las hebras de elementos en común son difíciles de identificar cuando las transiciones son consideradas separadamente. Cuando se las agrupa según su dirección de cambio, es decir, expansión o condensación, los hilos en común emergen más fácilmente, y proveen un entendimiento a la función.

Entre las transiciones expansivas (Fig. 16.6), una de las más básicas es la transición sol-gel (panel superior). Esta transición es expansiva en el sentido de que encarna el crecimiento de monómeros hasta polímeros, y el crecimiento de polímeros hacia matrices de gel tales como las del huso mitótico. La polimerización y la gelificación son fenómenos críticos: una vez comenzados, continúan hasta la finalización.

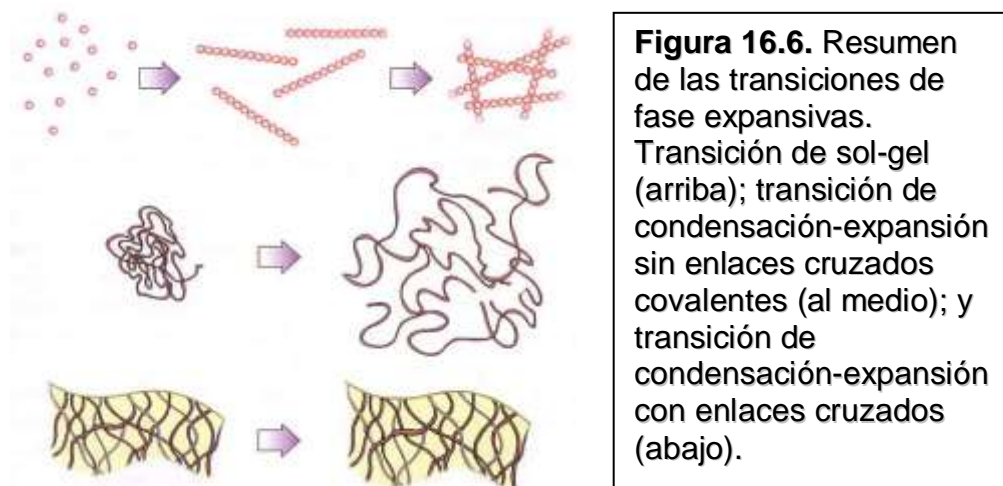


Figura 16.6. Resumen de las transiciones de fase expansivas. Transición de sol-gel (arriba); transición de condensación-expansión sin enlaces cruzados covalentes (al medio); y transición de condensación-expansión con enlaces cruzados (abajo).

Otro tipo de transición expansiva incluye a las que ocurren en el gránulo secretorio y en el citoesqueleto periférico (Capítulos 9 y 10). En la vesícula secretoria (panel medio) una red polimérica es inicialmente condensada en un paquete seco, ajustado, con sus hebras constituyentes puenteadas por cationes divalentes. Al reemplazar los iones monovalentes a estos divalentes, las hebras se separan y adsorben agua, permitiendo a los divalentes difundir hacia fuera y cumplir con su tarea secretoria asignada. De forma similar, la matriz citoesquelética se halla comúnmente condensada (panel inferior). La red condensada crea una barrera que restringe el intercambio de solutos entre el interior y el exterior de la célula. Al reemplazar los monovalentes al calcio, las hebras poliméricas constituyentes se separan y se embeben con agua. Debido a que las hebras están conectadas por enlaces transversales covalentes, sin embargo, la expansión es limitada. La energía elástica impartida a la red podrá luego ayudar a retornar la matriz a su condición inicial.

En cuanto a las transiciones de fase que son contráctiles (Fig. 16.7), un ejemplo común es el que acorta el manojo de filamentos de actina (izquierda). Como las transiciones expansivas, esta transición contráctil parece involucrar al calcio. El calcio precipita suspensiones de actina (Szent-Györgyi, 1951), condensa la actina filamentosa en manojos (Tang y Janmey, 1996), y contrae los geles de filamentos de actina reduciéndolos a tabletas (Bray, 1992). El rol del calcio en el atado de filamentos de actina podría así ser similar a aquel en el citoesqueleto periférico y la vesícula secretoria: condensar mediante el puentado divalente.

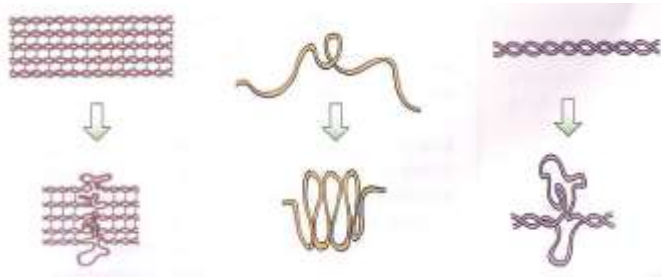


Figura 16.7. Ejemplos de transiciones de fase contráctiles. Transición de condensación de la actina (izquierda); transición de hélice-espiral (al medio); y transición de espiral extendido a lámina beta (derecha).

En transiciones de condensación tales como estas, los enlaces transversales covalentes podrían también jugar un rol –como lo hacen en las transiciones expansivas. En geles carentes de enlaces transversales, los filamentos pueden contraerse quedando como una pequeña tableta al ser expelida el agua. Por lo general, los filamentos ligados transversalmente no pueden contraerse tan dramáticamente porque los enlaces impiden la separación de los filamentos; de ese modo el entramado retiene agua, cuya estructura a su vez restringe el progreso de la transición de fase. Así, el músculo estriado se contrae modestamente (excepto en casos patológicos donde la ruptura de los enlaces transversales resulta en una contractura semejante a un nudo). Los músculos lisos, por otro lado, como asimismo los anillos contráctiles, los geles de actina sintéticos, y otras organelas con pocos enlaces cruzados covalentes y con estructuras semi-aleatorias, pueden acortarse masivamente. La extensión de la condensación depende de la extensión del enlazamiento transversal.

Otra transición contráctil es aquella que ocurre en los microtúbulos. La homología de la tubulina con la actina insinúa que las dos transiciones podrían operar a través de principios mecanicistas similares –y efectivamente, la propagación a lo largo de microtúbulos comparte muchos rasgos en común con la propagación a lo largo de manojos de filamentos de actina (Capítulos 11 y 12).

Finalmente, ciertas transiciones contráctiles parecen estar diseñadas para roles especializados. En la transición hélice-espiral de la miosina (Capítulo 14), una hélice alfa se contrae hasta convertirse en un espiral aleatorio para producir una tensión prodigiosa (Fig. 16.7, al medio). En la molécula de titina, campos de gran extensión de un espiral se condensan en láminas beta, generando igualmente un acortamiento prodigioso (derecha). Las transiciones de este tipo se especializan en los extremos del comportamiento mecánico.

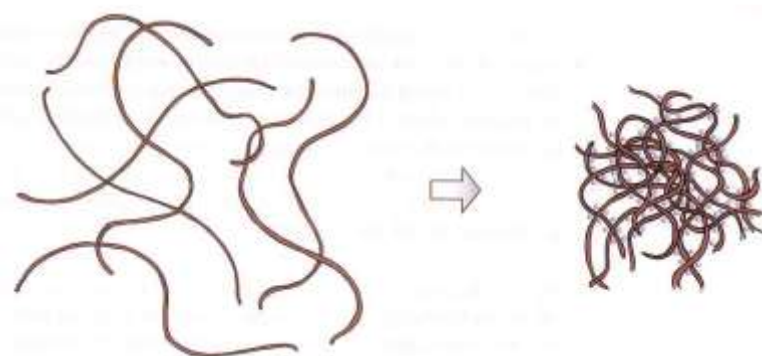


Figura 16.8. Rol central de los cationes divalentes. A través del puenteo de hebras aniónicas vecinas, el calcio y otros cationes divalentes precipitan la condensación y la expulsión del agua.

De esta sucinta revisión se revelan unas pocas observaciones. Quizás la más obvia es la variedad de transiciones. La variedad parecería reflejar la diversidad de tareas –abarcando desde el cambio en la permeabilidad, el transporte iónico

y la expulsión de solutos, hasta el cambio en la forma, la generación de fuerza, el acortamiento de hebras, *etc.* Tales tareas son suficientemente dispares como para justificar algún grado de especialización mecanicista. Las vesículas ricas en resortes condensados son ideales para arrojar solutos afuera; las transiciones hélice-espiral son precisamente lo apropiado para contracciones en contra de elevadas cargas; las condensaciones desde espirales extendidos hasta beta-láminas son incomparables para llevar a cabo cambios de longitud de gran escala; *etc.* Diversas transiciones satisfacen diversas necesidades.

Más reveladoras que las diferencias son, quizás, los rasgos distintivos en común. Un rasgo común digno de reiteración es la naturaleza cooperativa de las transiciones. Las transiciones no son eventos moleculares unitarios, sino acciones globales. Una vez que el umbral crítico es traspasado, la transición procede con la inevitabilidad de un estornudo. De esta manera, el sistema actúa como un amplificador, convirtiendo un pequeño cambio medioambiental en una respuesta inevitablemente magnífica.

Un segundo rasgo en común es la participación de los cationes divalentes, especialmente la del calcio (Fig. 16.8). Esto no es una sorpresa. El calcio está involucrado en numerosos aspectos de la función celular y, si tales funciones se basan en las transiciones de fase, entonces las transiciones de fase deben, a su vez, basarse en el calcio. La lógica es clara. El calcio parece operar consistentemente: mediante el puenteo de hebras aniónicas, puede condensar la matriz y estrujar el agua hacia fuera. Inversamente, cuando el calcio es reemplazado a través de la sustitución monovalente, la red es aflojada y el agua es sorbida de vuelta hacia adentro. El traslado de agua hacia dentro y afuera de la red es fundamental para la función, y en el centro de todo esto se halla el calcio.

La acción condensante del calcio depende de la negatividad de superficie, y quizás este es el momento apropiado para reflexionar sobre por qué la naturaleza ha sido tan consecuente en elegir este itinerario negativo. Las proteínas estructurales tales como los filamentos de actina, los microtúbulos y los filamentos intermedios –incluso el ADN– están todas negativamente cargadas. Los conectores transversales, en contraste, se hallan positivamente cargados. Estos incluyen a proteínas de puenteo y atadura, como también a divalentes. Todo esto parece tener un sentido –pero entonces nuevamente, ¿por qué las polaridades no están invertidas? ¿Por qué no podrían las proteínas estructurales estar positivamente cargadas y los conectores transversales negativamente cargados?

La ruta negativa para las proteínas estructurales podría haber surgido a partir de un requerimiento de ATP. Según la hipótesis propuesta (Capítulo 15), la carga negativa del ATP y la carga negativa de la proteína sirven para inducir la extensión proteica, la cual es crítica para la transferencia de energía. La “elección” de la negatividad de superficie podría así seguir los dictados de esta extraordinariamente hábil e incomparable molécula. Teóricamente, los sistemas biológicos podrían estar contruidos por polímeros estructurales con una carga neta positiva. Los aniones divalentes mediarían entonces la condensación, y el sistema de abastecimiento de energía requeriría una contraparte positivamente cargada del ATP. Semejantes sistemas “inversos” bien podrían ser la base de una vida diferente a la que conocemos – quizás acechando en algún sitio en otra galaxia.

LECCIONES DE LA BIOLOGÍA

Habiendo hecho hincapié en el pasado y el presente, concluyo con especulaciones sobre el futuro. Parecería impropio de su condición que de este material no emergiesen algunos pronósticos, ya que es poca la reserva ejercitada hasta ahora. ¿A dónde podría llevarnos toda esta chutzpah?

Con un poco de suerte, a una manera de pensamiento productiva. El nuevo paradigma grafica un rumbo definido. Para abordar un mecanismo biológico celular desconocido, el manual de instrucciones estipula, “primeramente busque algún tipo de transición de fase y prosiga desde allí”. Este enfoque podría parecer inquebrantablemente estrecho, pero el poder interpretativo hasta ahora exhibido por la transición de fase la insinúa como un camino que valdría la pena emprender.

Algo que me lleva hacia un significado relacionado –el paralelismo entre lo natural y lo artificial. La similitud funcional entre geles naturales y geles artificiales ha sido reiterada frecuentemente. Desde la solubilidad, hasta la permeabilidad, el comportamiento eléctrico, los cambios de volumen, las separaciones de fase y así sucesivamente, los geles naturales y sintéticos exhiben comportamientos paralelos. Hasta animales secos pueden rehidratarse y revivir precisamente como los polímeros secos pueden rehidratarse y funcionar. Por lo tanto, los geles biológicos no son particularmente especiales –excepto por el grado en que su operatividad ha sido optimizada por las fuerzas evolutivas de largo plazo. La naturaleza ha tenido cuatro mil millones de años para desarrollar su maestría, mientras que los ingenieros y químicos trabajando sobre geles sintéticos apenas contaron con unas pocas décadas.

Con una ventaja tan cuantiosa, era de esperar que el producto de la naturaleza hubiese llegado un poco más lejos que el producto urdido por humanos. De hecho, los fenómenos naturales están sólo apenas empezando a ser explotados por los ingenieros para un uso práctico: por ejemplo, la transición de beta-lámina hacia espiral extendido y la transición desde alfa-hélice hacia espiral aleatorio (Aggeli *et al.*, 1997; Perka *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999); también, el empaque de drogas dentro de vesículas poli-iónicas para su suministro de forma análoga a la secreción a los tejidos (Verdugo *et al.*, 1995). Lo que funciona para la célula debería funcionar para el gel. Inversamente, los logros de ingenieros pueden brindar pistas respecto de cómo es el funcionamiento de la célula. La frecuencia modulada (FM) fue utilizada en sistemas de comunicación eléctricos bastante antes de que se supiese que el mismo principio era usado en la comunicación neural.

Estas expectativas se extienden más allá de los límites de la biomímesis, un campo pujante que explota principios biológicos para su aplicación práctica. Yo sugeriría audazmente que, una vez comprendido, todo principio utilizado por la naturaleza será eventualmente utilizado por ingenieros. Esta afirmación no se puede probar o refutar, pero me recuerda a los microprocesadores de computadoras, donde los ingenieros han basado la comunicación artificial sobre el silicio. Para la comunicación biológica, la naturaleza ha elegido el carbono. Entre todos los elementos, el silicio es el más cercano al carbono en términos de propiedades químicas. ¿Coincidencia o inevitabilidad? Cuando los

biólogos desentrañen los principios operativos de la naturaleza, los ingenieros podrán tener mucho que aprender en tanto quedan embobados.

Finalmente, retornamos al rasgo distintivo con el que empezó este libro: la simplicidad. La simplicidad es una virtud por la cual los ingenieros se esfuerzan –se halla prácticamente integrada dentro del circuito de su genoma. Los mecanismos complicados ciertamente poseen su encanto, pero los ingenieros avezados comprenden que, para un funcionamiento confiable, los mecanismos deben mantenerse tan simples como sea posible. La cuestión es si acaso este principio no debiera también aplicarse para mecanismos que están logrados celestialmente. Para que los mecanismos celulares funcionen confiablemente, ¿no deberían basarse en principios simples –incluso bellos?

En el seno de semejante entramado yace la transición de fase, un proceso holgadamente potente disparado por un pequeño cambio medioambiental. Queda por ver si este proceso realmente es tan simple y tan poderoso como para reducir el actualmente desconcertante conjunto de epiciclos intracelulares a unas pocas órbitas funcionales. Les rogamos permanecer sintonizados.

Este libro desafía el conocimiento actual de cómo funciona la célula. Enfatiza la naturaleza geliforme de la célula, y construye sobre este rasgo distintivo para explorar mecanismos subyacentes a la comunicación, el transporte, la contracción, la división y otras funciones esenciales de la célula. Los mecanismos resultan siendo considerablemente más simples que aquellos previstos actualmente. El libro es tan visionario como provocativo, y está escrito en un estilo accesible para el no-experto.

Continúa desde la contratapa:

“Células, Geles y los Motores de la Vida muestra el poder de tratar la célula como realmente es –un gel. Con este enfoque, Pollack crea un fresco y convincente nuevo fundamento para la biología celular. Cualquier persona interesada en descubrir los secretos de la naturaleza se verá obligada por su curiosidad a leer este libro. Una vez que empecé, no pude parar de leer”. **Y. Osada, Profesor y Director, Laboratorio de Soft- y Wetware, Univ. de Hokkaido.**

“Esta es una magnífica lectura. Una discusión muy atractiva que constantemente da con una solución respecto de cosas a las que yo (y probablemente la mayoría de gente en esta área) les he dado vueltas, y desafía al lector a repensar temas que a menudo se dan por sentado”. **Paul Janmey, Profesor de Fisiología, Univ. de Pennsylvania**

“Un libro sumamente importante. Impresionante y convincente para cualquier persona libre de prejuicios”. **Frank Mayer, Director, Departamento de Biología Estructural, Univ. Georg-August, Göttingen, Alemania**

“Células y Geles se lee como un relato de detectives. No pude parar de leer hasta ser resuelta la trama”. **Hiromasa Ishiwatari, Decano, Escuela de Graduados de Ciencias de la Salud, Univ. de Suzuka, Japón**

www.cellsandgels.com



El Dr. Gerald Pollack es un líder internacional en el campo de la contracción y motilidad muscular. Recibió su doctorado de la Universidad de Pennsylvania en 1968, y actualmente es Profesor de Bioingeniería de la Universidad de Washington, en Seattle. Sus intereses se han extendido en términos generales desde la dinámica y la electrofisiología cardíacas hasta la contracción muscular y la biología celular. Durante diez años encabezó la subvención de un programa multi-investigador para estudiar el mecanismo molecular de la contracción muscular. Ha ganado

numerosas distinciones incluyendo el Premio Kulka, el Premio JSEM Scientific Paper, y la Membresía como Fundador del Instituto Americano de Ingenieros Biomédicos. Organizó diversas conferencias internacionales, integró varias juntas editoriales de publicaciones científicas y es autor de nueve libros. Su libro de 1990, *Músculos y Moléculas: Develando los Principios del Movimiento Biológico*, ganó un “Premio a la Excelencia” de la Sociedad para la Comunicación Técnica.

Contratapa:

Comentarios de profesionales y estudiantes de todo el mundo...

“Lleno de profundas revelaciones físicas a las relaciones estructura/función biológicas. Lo hallé refrescantemente iconoclasta, sensible y creíble”. **Peter Basser, Jefe, Biofísica y Biomímesis de Tejidos, National Institutes of Health, EE. UU.**

“Este fascinante libro formula un concepto de función biológica elemental que es auto-consistente y difícil de contradecir. Generará turbulencias en el ámbito científico convencional. Es asombroso cuantas incongruencias se han descubierto en el conocimiento actual de la biología. El estilo es culto y perspicaz, y gracias a su intensidad, logra que conceptos difíciles sean fáciles de comprender”. **Rainel Gülch, Profesor de Fisiología Humana, Universidad de Tübingen, Alemania**

“Me atrapó por completo desde la primera página. Que buen material. Me hallé ´ haciéndome tiempo ´ para leerlo”. **Erwin Vogler, Profesor Asociado, Ciencia e Ingeniería de Materiales, Universidad Estatal de Pennsylvania**

“En un estilo placentero y legible, Pollack abre una puerta hacia la biología del tercer milenio. Hace preguntas penetrantes que no nacen salidas de su imaginación sino a partir del cuidadoso análisis de extraños resultados obtenidos por muchos investigadores que no cuadran con los paradigmas actuales”. **Pascale Mentré, Maître de Conf., Universidad Pierre & Marie Curie, Paris, Francia**

“Llevé este libro conmigo por algún tiempo y finalmente lo saqué en un vuelo reciente, y literalmente no pude dejarlo. Es muy bueno”. **Joseph Andrade, Profesor y ex Decano de Ingeniería, Universidad de Utah**

“Si se comprueba que la tesis avanzada aquí es sensata, habrá una revolución en la biología celular. Este libro ofrece una dramática alternativa a la ´ sabiduría convencional ´ de la biología celular contemporánea. Parte del material está profundamente incrustado en la controversia, y aunque no siempre estuve de acuerdo con los detalles, el mensaje global se descubre claramente en este estimulante y disfrutable libro. Pollack escribe con un estilo placentero, a menudo humorístico. Si deseas explorar el espíritu del disenso científico calificado, este libro es para vos”. **James Clegg, Profesor de Biología Molecular y Celular, UC Davis**

“Estoy loco de contento acerca de este libro. Tras empezarlo supe que debía terminar el desarrollo de la historia de nuevos actores celulares y acciones celulares. Toda currícula de biología celular debería incluir esta novedosa y

vigorizante perspectiva. **John Watterson, Profesor Emérito, Universidad de Griffith, Gold Coast, Australia**

“Sólo deseo que hubiera podido tener este libro a mano cuando tomaba clases de biología y bioquímica. Es incitante al pensamiento en muchas formas”. **Paul Yang, estudiante de medicina, Facultad de Dartmouth**

“Nunca leí un trabajo tan impresionante desde que ingresé en la universidad 11 años atrás. Se convertirá en mi biblia científica”. **Hirohisa Tamagawa, Adjunta de Investigación, Universidad de Gifu, Japón**

“Acabo de terminar el libro y ¡lo encuentro fabuloso! Lo que más me gusta es su poca seriedad y las excelentes descripciones. Proveen una lectura fácil, a diferencia de otro material científico aburridor”. **Rhianna Derenick, estudiante de pre-grado, Universidad de Washington**

“Leí el libro de un solo tiro. Expone la belleza de una tensión crítica entre dos polos de percepción, y el placer intelectual de perseguir la resolución creativa”. **Reuven Tirosh, Jefe Científico, Schottenstein Center, Universidad de Bar Ilan, Israel**

...continúa en la solapa frontal

