

La dinámica de la energía de activación molecular en la superación del principio de reversibilidad microscópica

Prof. Emérito Dr. Alfredo Bennun^{1,2}

¹Rutgers University, NJ, USA

²Banco de Consultores del CONICET, Bioquímica y Biología Molecular, AR

RESUMEN

Influenciado por la convicción de Claude Bernard de que los fenómenos vitales tienen una base física y química, en contraposición con la conceptualización vitalista, Bernardo Houssay, en 1910 por hipofisectomía pudo relacionar el trabajo glandular con acción sobre el metabolismo. Observó síndromes hipofisarios como adiposidad, tolerancia muy marcada a los azúcares, etc. Inició el determinismo transformador de la fisiología y la medicina experimental Argentina. Luis Leloir demostró que la reacción de biosíntesis de glucógeno era una vía metabólica diferente de la degradativa y no condicionada por la termodinámica de acción de masa. Las direcciones metabólicas del uso de energía y de su reserva fueron separadas por el control bioquímico y hormonal. Una designación de “animado” excede la conceptualización de propiedades dinámicas de la proteína. La captación por hemoglobina de O_2 y Mg^{2+} -hidratado funciona con incremento mutuo de afinidad. Presinápticamente el Ca^{2+} descarga vesículas de noradrenalina y decrece permeabilidad de la barrera hematoencefálica e inhibe adenilato ciclasa. Desoxigenación libera Mg^{2+} parcialmente hidratado con mayor carga efectiva. Lo cual, incrementa la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a O_2 y glucosa, incrementando la respuesta a noradrenalina del adenilato ciclasa. Ésta sincroniza el potencial de acción con formación de adenosín monofosfato-3',5' cíclico, activando formación de memoria.

Palabras claves: Hemoglobina; estructura y función; dinámica de agua-proteína; función sináptica; Mg^{2+} integrador de estructura y función, formación de memoria a largo plazo.

Introducción

La síntesis de urea en 1828 por Friedrich Wohler [1] fue el primer golpe a la teoría vitalista. Esta formulada a nivel teórico tuvo como principal exponente a Paul Joseph Barthez (1734-1806). El vitalismo adquirió fuerza en biología entre 1830 y 1880 cuando apartó lo vivo de

[1] Kinne-Saffran, E. and Kinne, R.K.H., “Vitalism and Synthesis of Urea”; *American Journal of Nephrology*, 1999, vol 19, p 290-294.

las explicaciones cartesianas y reduccionistas, sin caer en lo sobrenatural [2]. Propusieron que la vida podía superar los principios termodinámicos aplicables a la materia no-viviente.

La perspectiva termodinámica de J. Maxwell (1874) [3] propone que una molécula constitutiva presenta propiedades diferentes del cuerpo al que pertenece.

J. Johnstone (1921) [4] análoga un máquina inanimada con músculo que contiene sustancias no-vivientes que trabajan metabólicamente para entregar energía.

Prigogine (1947) [5] desarrolló un criterio evolutivo para estados de no-equilibrio en sistemas de reacción química sin invalidar producción de máxima entropía [6].

J. Monod [7] [8] describe evolución como un proceso irreversible con una dirección enmarcada por el incremento de entropía.

J. Wicken [9] señala que el universo en su expansión mantiene un desequilibrio entre pozos de energía potencial y formas térmicas de energía. Dichos pozos de entalpía podrían incluir fluctuaciones primordiales de energía por la vida media del decaimiento de partículas que conforma un parámetro cronológico, generando una flecha del tiempo [10].

-
- [2] Bechtel, W. and Richardson. R.C. *Vitalism*. In E. Craig (Ed.), London, Routledge Encyclopedia of Philosophy, 1998.
- [3] Bennet, C., "Demons, Engines and the Second Law"; *Scientific American*, 1987, vol 255, n° 11, p 108-116.
- [4] Johnstone, J. *The Mechanism of Life in Relation to Modern Physical Theory*. In Longmans, Green & Co., 1921, p 159-193.
- [5] Prigogine, I. *Modération et transformations irreversibles des systemes ouverts*. Bulletin de la Classe des Sciences., Academie Royale de Belgique, 1945, 31, p 600-606.
- [6] Onsager, L., "Reciprocal relations in irreversible processes, I"; *Physical Review*, 1931, vol 37, 4, p 405-426.
- [7] Monod, J. *Chance and Necessity: An Essay on the Natural Philosophy of Modern Biology*. Trans. Austryn Wainhouse, New York: Vintage, 1972.
- [8] Prigogine I. "Etude thermodynamique des phenomenes irréversibles"; *Acad. Roy. Belg. Bull. Cl. Sc.* 1945, vol 31, p 600.
- [9] Wicken, J.S. *Evolution, Thermodynamics, and Information: Extending the Darwinian Program*. Oxford University Press. 1987, p 72.
- [10] Bennun, A., "Primordial open-system thermodynamics and the origin of a biophysics selection principle"; *Journal of Biophysics, OJBIPHY*, 2012, Vol. 2, n° 3, p 72-79.

RELACIONES TERMODINÁMICAS CON EL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS

El Dr. Alberto B. Houssay [11] se incorporó en 1907 al Departamento de Fisiología, completó su tesis en 1911. Impulsó la medicina experimental en la Argentina. Recibió el Nobel de Medicina en 1947, otorgado por sus descubrimientos sobre el rol de las hormonas pituitarias en la regulación de glucosa en sangre. El premio fue compartido con Carl Ferdinand y su esposa Gerta Theresa Cori, por la elucidación de la acción de la adrenalina en la degradación de glucógeno: $\text{Glucógeno}_{n+1} + \text{Pi}$ (fosfato inorgánico) \rightarrow (catalizador: glucógeno fosforilasa) \rightarrow $\text{glucógeno}_n + \text{glucosa 1-fosfato}$, con $\Delta G^0 = -0.5 \text{ kcal/mol}$. Como el catalizador es la misma enzima, este cambio de direccionalidad es posible por reversibilidad microscópica. Pero, fisiológicamente las concentraciones de producto Pi es 100 veces la del sustrato glucosa 1-fosfato e insume energía libre: $\Delta G' = -0.5 + 1.4 \cdot \log\left[\frac{[\text{Pi}]}{[\text{glucosa 1-fosfato}]}\right] = 2.3 \text{ kcal/mol}$. Los Coris sintetizaron glucógeno usando fosforilasa *in vitro* a partir de una alto nivel de glucosa 1-fosfato y una enzima de ramificación.

Esta reversibilidad no sólo está restringida termodinámicamente sino también por los tiempos de acción hormonal, para la activación-desactivación de enzimas. El metabolismo celular no está atrapado por una reversibilidad microscópica simultáneamente bi-direccionalidad que no permite diferenciar entre las vías de síntesis y la degradativa.

Luis F. Leloir, Premio Nobel de Química en 1970, en 1957 mostró que el glucógeno es sintetizado [12]: $\text{Glucógeno}_n + \text{uridina difosfato glucosa (UDP-glucosa)} \rightarrow$ (glucógeno sintasa) $\rightarrow \text{glucógeno}_{n+1} + \text{UDP}$. Contrariamente a los vitalistas su trabajo y los de otros laboratorios en el mundo muestran que los principios termodinámicos subsisten y no son reemplazados *ad-hoc*, sino que están subordinados a la multiplicidad enzimática y su complementariedad hormonal en tejidos en red metabólica. por una vía metabólica diferente a la vía degradativa.

[11] Houssay, A.B. *Estudios sobre la acción de los extractos hipofisarios*. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Buenos Aires. Ensayos sobre la fisiología del lóbulo posterior de la hipótesis., "La ciencia Médica", Librería y Casa Editora de A. Guidi Buffarini, 1911.

[12] Parodi, A.J., Mordoh J., Krisman C.R., Leloir L.F., "In vitro synthesis of particulate glycogen from uridine diphosphate glucose"; *Arch Biochem Biophys*, 1969, vol 132, 1, p 111-7.

ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE RECEPTORES-ENZIMA EN MEMBRANA

Andrés O.M. Stoppani discípulo de Bernardo Houssay, cuya cátedra universitaria integró, dirigió la tesis doctoral de César Milstein y otros. Tuvo una actuación descollante en el campo científico. Fue investigador emérito, presidente honorario del Conicet y fundador del laboratorio de metabolismo celular de la Comisión Nacional de Energía Atómica y propulsó la investigación con radioisótopos en metabolismo celular.

En su laboratorio se mostró que la acción del 2,4-dinitrofenol, como inhibidor de la oxidación por la levadura del acetato y el piruvato exógenos, actúa a través de desacoplar la fosforilación oxidativa que genera adenosina trifosfato (ATP) [13] [14] [15] [16].

El 2,4-dinitrofenol se pudo usar como marcador para aislar la ATPasa-ATP-sintasa que funciona en la fosforilación oxidativa en levadura [17].

Las preparaciones particuladas de cloroplasto al ser iluminadas en presencia de Mg^{2+} y del desacoplante cisteína después de 5-12 min inducen una actividad de ATPasa denominada *luz-triggered* que se mantiene en la oscuridad hasta ~20 min. Por lo que se asumió que el intermediario energético formado se correspondía a un cambio conformacional que persistía por igual período de tiempo. Ca^{2+} también se mostró como desacoplante de fotofosforilación, pero al apagar la luz la reacción no continúa en la

-
- [13] Stoppani, A.O.M., Ramos, E.H., Widuczynski, I., Bennun, A. and De Pahn, E.M., "The effect of 2,4-dinitrophenol on the oxidation of endogenous and exogenous substrates by the yeast *Saccharomyces Cerevisiae*"; Proceedings Conference, México City, 1961, in "Use of Radioisotopes in Animal Biology and the Medical Sciences" (C.M. Fried et al., eds.) Vol. 1, (1962), pp. 241-252, Academic Press, London.
- [14] Stoppani, A.O.M., Bennun, A. and De Pahn, E.M., "Energy requirement for the anaerobic oxidation of acetate in baker's yeast"; *Biochimica et Biophysica*. 1964, acta 92, p 176-178.
- [15] Stoppani, A.O.M., Bennun, A. and De Pahn, E.M., "Effect of 2,4-dinitrophenol on krebs cycle and phosphate metabolism in baker's yeast"; *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1964, vol 108, n° 2, p 258-265.
- [16] Stoppani, A.O.M., Bennun, A. and De Pahn, E.M., Effect of DNP on the metabolism of phosphates in *Saccharomyces cerevisiae*, "5th inter-American Symposium on the Peaceful Application of Nuclear Energy" in Symposium sponsored by the inter-American Nuclear Energy Commission and the Government of Chile, Valparaíso, Chile, 1964, J.D. Perkinson and the Secretariat of IANEC, 1965, pp. 59-68. Organization of American States, Washington, D.C.
- [17] Bennun, A., De Pahn, E.M. and Stoppani, A.O.M., "Some properties of particle-bound intracellular ATPase from baker's yeast"; *Biochimica et Biophysica*. 1964, acta 89, p 532-539.

oscuridad, por lo que se la denominó luz-dependiente ATPasa, ya que implica un cambio conformacional persistente por sólo unos pocos segundos [18].

Las afinidades por adenosín difosfato (ADP) y guanosín difosfato (GDP) como inhibidores competitivos de luz-triggered y luz-dependiente ATPasas es idéntica a su afinidad como sustratos de fotofosforilación en la cloroplasto factor-1 (CF₁) funcionando como sintasa. Por resolución se obtuvo CF₁ soluble que por incubación con los fragmentos residuales en MgCl₂ permitió reconstituir partículas en la que el CF₁-ligado restauraba las tres funciones dependientes de la luz. indicando la presencia en CF₁ de un centro activo acoplable como ATP-sintasa ó ATPasa.

La ATPasa activada se estudió por titulación con glicerol, lo que permitió distinguir agua libre de la localizada alrededor de grupos hidrofílicos estructurando el centro activo. Este respondió a la acción de masa del agua con una cooperatividad n=16 moléculas de agua, durante la transición de ATPasa de su forma activa a inactiva. Por lo tanto, la arquitectura del centro activo es dependiente de la acción de masa del agua [19].

El entorno deshidratante está en *turnover* en función de Mg²⁺ que pierde parte de su esfera de hidratación al ligar una proteína y aumentar su carga efectiva. Adquiere así la tendencia a sustraer H₂O de las esferas de hidratación que pertenecen a iones.

Recambio (*turnover*) permite en CF₁ una dinámica ΔpK_a entre su mayor valor con menor disociación de H⁺ y su menor valor que permite liberarlos.

La dinámica de agua implica que una esfera de hidratación es un activador latente cuyo potencial esta en ruptura y recomposición de enlaces de H (enlaces-H). Por lo cual, funciona como una fuente de entalpía durante la formación de estados de transición que resultan de cambios conformacionales en la estructura cuaternaria de proteína [20].

[18] Bennun, A., Avron, M., "Light-dependent and light-triggered adenosine triphosphatases in chloroplasts"; *Biochimica et Biophysica*. 1964, acta 79, p 646-648.

[19] Bennun A. "The dynamics of H-bonds of the hydration shells of ions, ATPase and NE-activated adenylyl cyclase on the coupling of energy and signal transduction"; arXiv.org > q-bio > arXiv:1208.5673. 2012.

[20] Bennun A. *Molecular Mechanisms Integrating Adenylyl Cyclase Responsiveness to Metabolic Control on Long-Term Emotional Memory and Associated Disorders. Horizons in Neuroscience Research*. Nova Science Publishers, Inc. 2013, vol 10, p 41-74..

La conformación bipyramidal trigonal surgiendo de pseudorotación puede desplazar carga y agua para permitir el ataque nucleofílico de ADP al fosfato inorgánico para formar ATP.

INTEGRACIÓN EN FUNCIÓN HORMONAL DE REDES METABÓLICAS

La carga de energía = $\frac{[ATP] + 1/2[ADP]}{([ATP] + [ADP] + [AMP])}$ [21] regula activación-desactivación de enzimas celulares endógenas, si se acerca al valor 1 el ATP activa las vías biosintéticas, como la síntesis de glucógeno, lípidos, etc. Los valores de 0.5 y más bajos indican que adenosín monofosfato (AMP) activa las vías oxidativas que generan el ATP.

Earl Sutherland, Premio Nobel de Medicina en 1971, mostró que la acción de adrenalina es la de un primer mensajero, actuando sobre un receptor en el exterior de la membrana celular. El receptor al captar la hormona activa una enzima, el adenilato ciclasa (AC) que convierte ATP en adenosín monofosfato 3',5'-cíclico (cAMP). Éste último, actúa como un segundo mensajero endógeno y transduce señales hormonales al metabolismo endocelular al activar la proteína kinasa-A. Ésta, fosforila otras enzimas como fosforilasa-b para activarla a la forma "a". Desfosforilación de esta última revierte a la forma "b".

La concentración en el equilibrio (mM)					
MgCl ₂	ATP _T	Mg ²⁺	MgATP	ATP ⁴⁻	[ATP ⁴⁻]/[Mg ²⁺]
0.1	1.0	0.008	0.084	0.91605	109
0.25	1.0	0.021	0.186	0.81360	38
0.5	1.0	0.042	0.314	0.68577	16
1.0	1.0	0.084	0.478	0.52181	6

Tabla 1: equilibrio iónico entre MgCl₂ que cambia de 0.1mM a 1mM y ATP total constante 1mM cambia la concentración de Mg²⁺, MgATP, y de ATP⁴⁻.

Harris [22] muestra que la concentración del Mg²⁺ libre que excede la concentración de sustrato MgATP (Tabla 1) permite la activación de la adrenalina estimulada AC en células

[21] Atkinson, D.E. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry*. 1968 Nov; 7(11):4030–4034.

[22] Harris, R.H., Cruz, R., Bennun, A., "The effect of hormones on metal and metal-ATP interactions with fat cell adenylate cyclase"; *Biosystems*. 1979, vol 11, p 29-46.

grasas [23]. Efecto similar se informa en Tabla 2 en que el exceso de Mg^{2+} libre permite condicionar la respuesta a la hormona de la insulina receptora tirosina kinasa (IRTK).

Metal divalente	Basal	+Insulina	$\Delta\%$ Insulina-basal
---	0.39	0.22	0
5mM Mg^{2+}	0.50	1.08	+111
5mM Mn^{2+}	9.18	12.18	+33
5mM Ca^{2+}	0.09	0.05	0

Tabla 2. Efecto de insulina en IRTK de hígado. El receptor de insulina de rata fue primero preincubado con insulina por 15min a 23°C. Subsecuentemente, se hizo una incubación con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 50 μM , 5×10^3 cpm/pmol actividad de kinasa medida por fosforilación del sustrato exógeno val5-angiotensina II. Actividad: nmol/h/mg [24].

Metal divalente	Basal	+0.1mM noradrenalina	$\Delta\%$ noradrenalina sobre basal
15mM Mg^{2+}	78 \pm 7	212 \pm 14(4)	+172
25mM $[\text{MgCl}_2]$ +0.3mM Ca^{2+}	0	27 \pm 2(4)	0

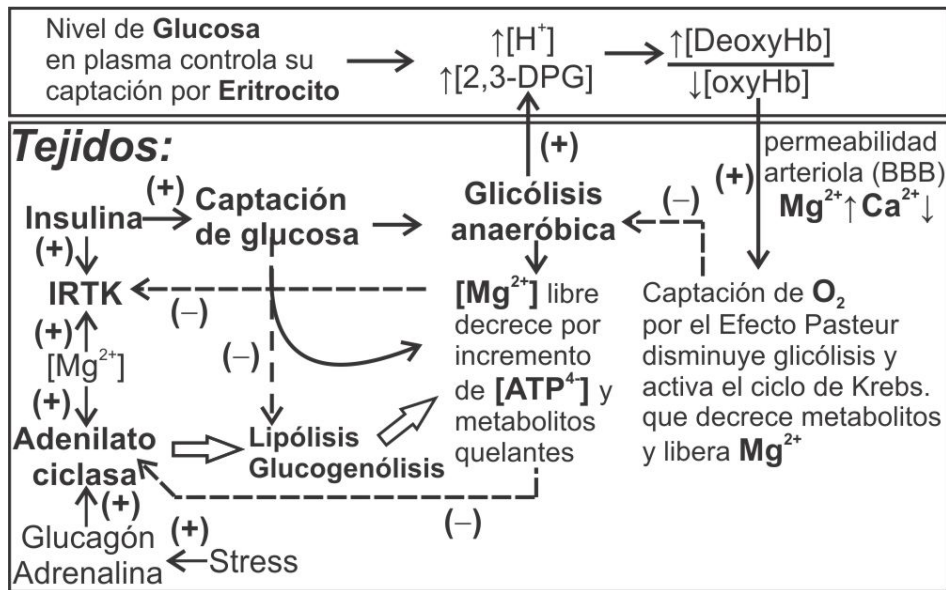
Tabla 3. Efecto de noradrenalina en adenilato ciclasa de la corteza cerebral. Actividad: nano-moles de cAMP formado/h por mg de proteína purificada como un ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)-extracto del particulado de corteza cerebral de rata. Éstos fueron incubados a variable concentración de Mg^{2+} [25] y 1mM de MgATP y 0.02 mM GTP (Sigma: purificada de musculo equino), valor de cooperatividad Hill, $n=3.9$ S. Brydon-Golz.

El equilibrio iónico permite condicionar la respuesta a las hormonas de las enzimas IRTK y AC permitiendo a una red integrada por tejidos como células grasas, hígado, etc., por ajuste hormonal responder a la necesidad del cerebro imponiéndose sobre la carga de energía a nivel celular de cada tejido.

[23] Harris, R., Bennun, A., "Hormonal control of fat cells adenylate cyclase"; *Molecular & Cellular Biochemistry*. 1976, vol 13, n° 3, p 141-146.

[24] Vicario, P.P., Bennun, A., "Separate effects of Mg^{2+} , MgATP and ATP4- on the kinetic mechanism for insulin receptor tyrosine kinase"; *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1990, vol 278, n° 1, p 99-105.

[25] Brydon-Golz, S., Ohanian, H., Bennun, A., "Effects of noradrenaline on the activation and the stability of brain adenylate cyclase"; *Biochem. J.* 1977, vol 166, p 473-483.



Esquema 1. Integración hormonal-metabólica implica la transducción de una misma señal *in common* en este caso el equilibrio iónico ya que la concentración del sustrato Mg/MnATP está modulada por la concentración de los iones disociados que son los que actúan como activadores Mg²⁺/Mn²⁺, versus los que son inhibidores Ca²⁺, ATP⁴⁻ y CaATP.

El AC de la corteza cerebral de la rata en ausencia de Mg²⁺ permite un período refractario potenciado por Ca²⁺. La descarga de Mg²⁺ integra la activación de la respuesta a neurotransmisores del AC.

La descarga de Mg²⁺ al nivel cerebroespinal es funcional para las neuronas que dependen de glicólisis aeróbica ya que permite a noradrenalina estimular AC.

El cAMP formado interactúa con núcleo-proteínas (cAMP Response Element-Binding, CREB) promotoras de la transcripción de ADN. El cAMP como segundo mensajero activa lipasa en células grasas que liberan ácidos grasos que ingresan al hígado para generar glucosa. En este tejido Mg²⁺ activa la receptora tirosina quinasa y respuesta a adrenalina del AC con cAMP acción activadora en cascada de fosforilasa-a y formación de glucosa-1-fosfato que se convierte en glucosa-6-fosfato. Éste permite a la glucosa-6-fosfatasa entregar glucosa a sangre. La complementariedad hormonal-metabólica que relaciona la tabla 1 y la tabla 2 con la función del Mg²⁺ de modular la capacidad de respuesta de las enzimas

asociadas a los receptores hormonales para IRTK y adrenalina estimulada-AC. El esquema 1 se puede aplicar al flujo de la información desde la red metabólica de células grasas e hígado al axis del sistema simpático: hipotálamo-(CRH)->Pituitaria anterior-(ACTH)->Corteza adrenal->(Cortisol) Médula adrenal->Adrenalina. La integración entre producción y regulación de glucosa con retroinformación a dicho axis requiere el control del paso de nutrientes, O₂, vitaminas y hormonas que se efectúa por astrocitos (glía limitans), entrelazándose alrededor de la neurona y constituye la barrera hematoencefálica. Ésta permite inhibición por retroalimentación a cortisol y no a adrenalina, por lo que la reacción de pelear-o-correr (en inglés, Fight-or-flight response) se puede volver disfuncional, resultando en patologías de estrés que afectan los ritmos circadianos de control de glucosa.

LA HEMOGLOBINA (Hb) COMO MOLÉCULA FUNCIONAL AL TRANSPORTE DE Mg²⁺

En 1970, Perutz [26] intentó darle un mecanismo estereoquímico a su resolución tridimensional de la estructura de hemoglobina (Hb). Partió de la función alostérica propuesta por Monod, Wyman y Changeux en 1965. Para lo cual adoptó un equilibrio entre dos estructuras alternativas una tensa (T), constreñida por puentes iónicos entre los C terminales de sus cuatro subunidades, y una baja afinidad por el O₂, y otra carente en enlaces iónicos más relajada (R) y de mayor afinidad por O₂.

La distancia en un grupo-R desde su carbono- α a su átomo negativo es: histidina=0.5nm, cisteína=0.23nm y aspartato=0.39nm. El magnesio, de radio atómico=0.150 nm y iónico (2+ ion)=0.086 nm, puede coordinar con grupos-R. Así, la distancia entre His β 92, más Mg²⁺, más His β 143 es igual a 1.30 nm. La distancia entre Fe²⁺ del Heme- β y el sitio de unión de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) es cercana a 1.3 nm. Los grupos laterales de la histidina con grupo anfotérico imidazol, pKa=6, a pH por encima disocia [-N:]. Estos contribuyen al menor pKa de oxihemoglobina, pKa=6.4, que facilita a los grupos-R quelar metales divalentes como Mg²⁺ o Zn²⁺. Por lo cual se puede asumir que oxiHb forma un puente dinámico mediado por

[26] Perutz, M.F., Wilkinson A.J., Paoli M., Dodson G.G., "The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited"; *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1998, vol 27, p 1-34.

un Mg^{2+} quelante, para que His β_1 y β_2 92 giren sobre el $C\alpha$ casi 180° y que no sean atractantes del Heme- Fe^{2+} y éste al alcanzar el plano exterior coordine O_2 .

A nivel alveolar el O_2 aumenta la afinidad de Hb por Mg^{2+} , oxiHb $pK_a=6.6$ tiene tendencia a ligar Mg^{2+} y ambos previenen y excluyen a 2,3-DPG y de H^+ de unirse a Hb.

Agua como ligante está relacionada con la oxigenación de Hb. Los cambios en la actividad de agua cambian el equilibrio bioquímico en proporción al número de moléculas de agua asociadas con la reacción.

Aproximadamente 60 moléculas extras de agua se unen a la Hb durante la transición de la forma tensa (T) deoxihemoglobina a la totalmente oxigenada forma relajada (R) [27].

La formación de oxi-hemoglobina ocurre con deslizamiento de los dímeros $\alpha_2-\beta_2$ versus $\alpha_1-\beta_1$ permitiendo el ingreso de las esferas hidratadas de Mg^{2+} para ligarse a los grupos-R a cada una de las interfaces hidrofílicas $\beta_2\alpha_1$ y $\beta_1\alpha_2$, actuando como transportadores de 2 a 4 Mg^{2+} .

Los iones de Mg^{2+} se deshidratan al ligarse con grupos-R que incluyen His β_1 y β_2 143, que por lo tanto en oxiHb no estarán disponibles para conformar un sitio de unión para 2,3-DPG.

El sistema eritrocito-Hb actúa como sensor [28] ya que la captación de glucosa es función de su nivel en plasma. La enzima 2,3-DPG-mutasa alcanza máxima actividad a $pH=7.4$ del líquido cerebroespinal generando 2,3-DPG. La deoxihemoglobina $pK_a=8.2$ asocia a los grupos imidazol un H^+ formando imidazolio cargados positivamente.

[27] Colombo, M.F., Rau, D.C., Parsegian, V.A., "Protein solvation in allosteric regulation: a water effect on hemoglobin"; *Science*. 1992, vol. 256, n° 5057, p 655-659.

[28] Salvay, A.G., Grigera, J.R., Colombo, M.F., "The role of hydration on the mechanism of allosteric regulation: in situ measurements of the oxygen-linked kinetics of water binding to hemoglobin"; *Biophys J*. 2003, vol 84, n° 1, p 564-70 (2003).

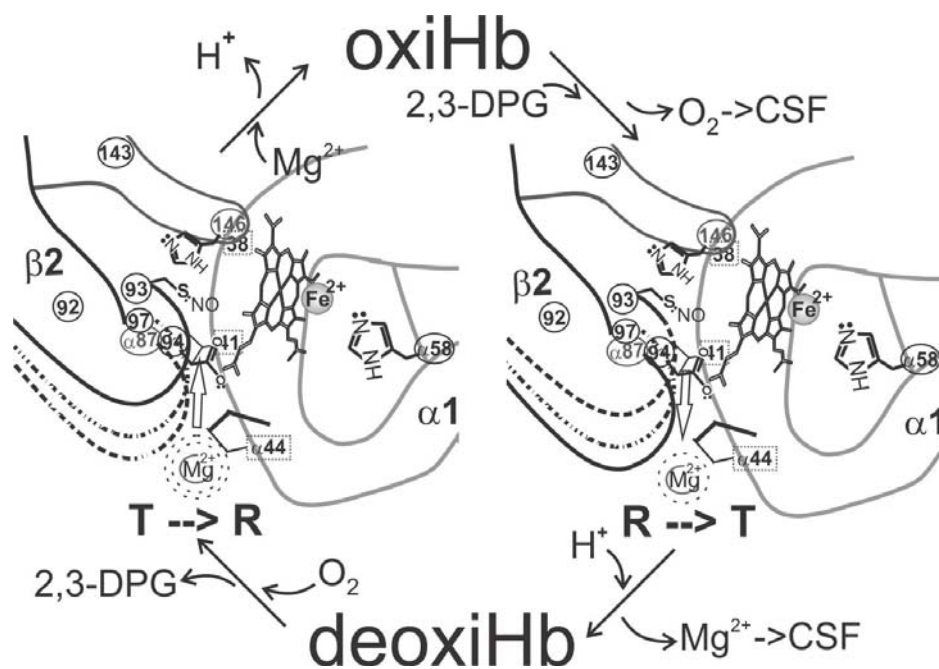


Figura 1. Deoxihemoglobina es ilustrada, $pK_a=8.2$, a $pH=7.4$ del líquido cerebroespinal, el átomo de N en imidazol tiende a conformar el imidazolio asociando un H^+ $[-NH^+]$. Las uniones peptídicas son rígidas en un plano en que dos carbonos α están separados 0.36 nm. Siguiendo al enlace peptídico se encuentra el $C\alpha$ que rota 180° desplazando sus grupos laterales-R.

En el estado imidazolio los grupos-R His no pueden retener el Mg^{2+} y la unión de 2,3-DPG y H^+ ligando a Hb la llevan a perder su afinidad por Mg^{2+} [29], permitiendo que en las cadenas β_1 y β_2 los imidazolios His 143 y los His 2 atraigan a los grupos de carga negativa del 2,3-DPG, ligante exergónico con $\Delta G=-5.7$ kcal/mol. Su disociación endergónica durante oxigenación requiere un acoplamiento simultáneo exergónico por asociación a Hb de 2 o 4 iones Mg^{2+} que pierden su esfera de hidratación. El agua disociada es parte de un balance que requiere 60 moléculas de agua adicionales para formar oxyHb. Ésta en su equilibrio con líquido cerebroespinal forma deoxyHb con entrega O_2 , Mg^{2+} y agua. Por balance se deduce que el tamaño de los clúster de agua en el líquido cerebroespinal es parte en el equilibrio en el ciclo oxyHb-deoxyHb.

[29] Bennun, A., Needle, M.A., DeBari, V.A., "Stimulation of the hexose monophosphate pathway in the human erythrocyte by Mn^{2+} : Evidence for a Mn^{2+} -dependent NADPH peroxidase activity"; *Biochemical Medicine*. 1985, vol 33, p 17-21.

HEMOGLOBINA EN EL TRANSPORTE DE Mg^{2+} Y LA RESPUESTA SINÁPTICA

El Mg^{2+} al ligar Hb pierde parte de su esfera de hidratación, por lo que se libera con mayor carga efectiva incrementando la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a O_2 y glucosa. Estimulación de una neurona presináptica moviliza Ca^{2+} para descargar las vesículas conteniendo el neurotransmisor noradrenalina que decrece la permeabilidad en las arteriolas asociadas a la barrera hematoencefálica.

En la sinapsis el adenilato ciclasa pasa de estar inhibido por Ca^{2+} a estar en presencia del neurotransmisor, pero recién se activa en el momento de disponibilidad de Mg^{2+} . Éste condiciona permeabilidad en el sistema arteriola-barrera hematoencefálica. Por lo cual, el potencial de acción asociado al Ca^{2+} se puede sincronizar con la formación endógena de adenosín monofosfato 3',5'-cíclico (cAMP).

Un Mg^{2+} parcialmente hidratado se simboliza aquí $[Mg(H_2O)_{\text{parc}}]^{2+}$ para mostrar que tiene mayor carga efectiva, y puede capturar agua de la esfera de hidratación de un Na^+ totalmente hidratado $[Na(H_2O)_6]^+$ que se transforma en parcialmente hidratado $[Na(H_2O)_{\text{parc}}]^+$. El ión Na^+ puede capturar agua de un K^+ totalmente hidratado $[K(H_2O)_6]^+$. Esta concadenación de tendencia a la hidratación permite decrecer el tamaño efectivo de estos iones. Lo cual, permite selección por un tamizado molecular que adapta el tamaño de la esfera de hidratación a sus canales iónicos respectivos durante la translocación iónica en la bomba de Na^+/K^+ . La descarga conjunta por el eritrocito de Mg^{2+} y glucosa al nivel de la barrera hematoencefálica permite que la glucólisis aeróbica en la neurona sincronice la disponibilidad de ATP para sustentar en una neurona excitada los movimientos iónicos que mantienen el potencial de acción.

El Mg^{2+} no solo activa el adenilato ciclasa sino que también es requerido para que el receptor de norepinefrina pueda asociarse a la membrana y al adenilato ciclasa. Lo que determina que en función de los sitios Mg^{2+} -saturables, la enzima en presencia del neurotransmisor puede incrementar su cooperatividad desde basal $n=2$ a $n=4.2$. Por lo cual, las neuronas que producen norepinefrina en el locus coeruleus, a través de sus largos

axones, puedan ramificarse para inervar el tronco del encéfalo, la médula espinal, el cerebelo, el hipotálamo, núcleos de relevo del tálamo, amígdala, y la neocorteza. Esta vinculación integra una red para adquisición de memoria emocional [30]. La generación de cAMP activa proteína kinasa que induce síntesis de proteína por activación de transcripción. Éste mecanismo de inducción se denomina en inglés cAMP-Response Element-Binding (CREB). Las proteínas sintetizadas confieren un locus a memoria al adherirse a través de Mg^{2+} a las membranas neuronales como lo hace el receptor de oxitocina. Ésta hormona emocionalmente vinculante implica para un recién nacido una memorización de su madre.

C. Milstein, premio Nobel de Medicina, en 1984, trabajó en estructuras de anticuerpos monoclonales y posteriormente en el mensajero RNA (ácido ribonucleico) codificante de anticuerpos. Su caracterización de una memoria inmunológica para diferenciar linfocitos se puede usar para expandir las limitaciones genéticas y visualizar vías adaptativas al reconocimiento del entorno que podría influenciar en la generación de circuitos neuronales.

Euglena gracilis deprivada de fosfato en su medio de cultivo induce la síntesis *de novo* de una nueva enzima, una fosfatasa ácida no específica (EC 3.1.3.2). la enzima inducida *in vitro* e *in vivo* es mucho más lábil que las enzimas constitutivas [31].

La necesidad de *Euglena* por fosfato activa genes que funcionan a un nivel molecular de inducción de enzimas compensadoras.

Como las células del cerebro prácticamente no se renuevan, la reversión térmica permitiría la desacumulación de proteínas inducidas por CREB y proveería un mecanismo de olvido con necesidad de rememoración a los procesos de formación de memoria. La noradrenalina magnifica la inestabilidad térmica del adenilato ciclasa, por lo cual, podría ser un mecanismo en la patología del pánico.

[30] Bennun, A. *Molecular Mechanisms Integrating Adenylyl Cyclase Responsiveness to Metabolic Control on Long-Term Emotional Memory and Associated Disorders. Horizons in Neuroscience Research*. Nova Science Publishers, Inc. 2013, vol 10, pp. 41-74.

[31] Bennun, A, Blum, J.J., "Properties of the induced acid phosphatase and of the constitutive acid phosphatase of *Euglena*"; *Biochim Biophys Acta*. 1966, vol 128, n° 1, p 106-123.

El crecimiento o cambio direccional de un organismo, o tropismo, puede estar presente en la vía evolutiva de creación de circuitos neuronales. La Euglena muestra cómo una célula primitiva puede adaptarse a un entorno metabólicamente variable, a través de un nivel genético de retroinformación. Por el cual, escasez de un metabolito como glucosa se puede convertir en estímulo para activar procesos de formación de circuitos como recompensa adaptativa.

Nedergaard M [32] et. al. mostraron que la estimulación de un clúster neuronal incrementaba el diámetro capilar y las neuronas recibían más nutrientes al excitarse. Esta relación de cooperación entre estímulo y nutriente se puede correlacionar anatómicamente por un promedio de 4 micras de contacto por neurona en el locus de conexión BBB-neurona. La disponibilidad de glucosa preserva el rol evolutivo de recompensa metabólica, al mantener la relación estímulo-señalización como una avidez por carbohidrato de neuronas que satisfacen al asociarse con circuitos neuronales que en el estado de excitación adquieren tendencia de incrementar su actividad/conectividad sináptica [33].

CONCLUSIONES

Los procesos térmicos por ser azarosos *per se* no son conducentes de los grupos-R de una proteína a una cinética espacialmente organizada, su valor termodinámico a temperatura ambiente es 0.8kcal/mol. Por lo tanto, la energía resultante de la ruptura de enlaces-H en el *clúster*, $(\text{H}_2\text{O})_n$, que puede ser evaluada para $\text{O}-\text{H}\cdots\text{O}$ como 5kcal/mol y para $\text{HO}-\text{H}\cdots\text{OH}_3^+$ como 4 kcal/mol se manifiesta como dominante y capaz de sostener cinética vectorial a través de enlaces-H que permiten a una proteína la captación endergónica de energía que

[32] O'Donnell, J., Zeppenfeld, D., McConnell, E., Pena, S., Nedergaard, M., "Norepinephrine: a neuromodulator that boosts the function of multiple cell types to optimize CNS performance"; *Neurochem Res.* 2012, vol 37, n° 11, p 2496-2512.

[33] Tully, K., Bolshakov, V. Y., "Emotional enhancement of memory: how norepinephrine enables synaptic plasticity"; *Mol Brain*, 2010, vol 13, n° 5, p 15.

puede contrarrestar la tendencia cinética conferida por la aleatoriedad del entorno térmico [34].

La disminución de "n" exergónica en el clúster de agua (H₂O)_n puede dar aumento endergónico en el número de enlaces-H dentro de una proteína o en la esfera de hidratación de un ión. Estos eventos tienden a impulsar formación de los estados de transición con un vector-cinético de progreso de la reacción. El acoplamiento entre el potencial metabólico termodinámico de la energía de activación con el potencial disipativo de enlaces-H por recambio conformacional de las esferas de hidratación entre iones y proteínas, permite mayormente a nivel de la bomba de Na⁺/K⁺ cerebral consumir el 20% del total del metabolismo corporal [35] [36]. Este trabajo está sostenido por la transferencia de enlaces-H con depleción de estas uniones entre moléculas de agua, que impone idéntico porcentaje en el recambio de 3.7×160ml/día de líquido cerebroespinal. El sistema linfático y venoso se adecua al nivel corporal a un metabolismo proporcionalmente lento. En cerebro el sistema linfático no existe, en cambio el líquido cerebroespinal se mueve muy rápidamente y muy profundamente, con intercambio líquido a través de un canal específico de agua que se encuentra en los astrocitos y parece importante para la limpieza de amiloide cerebral-β en ratones [37]. Esta estructura de circulación en el cerebro permite sustracción del calor metabólico y el latente generado por la ruptura de la estructura de enlaces-H por decaimiento exergónico de los clúster de agua exhausto de enlaces-H, y por lo tanto, liberando más fácilmente el vapor de agua exhalado.

-
- [34] Bennun, A. *Molecular Mechanisms Integrating Adenylyl Cyclase Responsiveness to Metabolic Control on Long-Term Emotional Memory and Associated Disorders. Horizons in Neuroscience Research*. Nova Science Publishers, Inc., 2013, Vol. 10, pp. 41-74.
- [35] Bennun, A. "The coupling of thermodynamics with the organizational water-protein intra-dynamics driven by the H-bonds dissipative potential of cluster water"; arXiv.org > q-bio > arXiv:1303.6993, 2013.
- [36] Bennun, A. "The dynamics of H-bonds of the hydration shells of ions, ATPase and NE-activated adenylyl cyclase on the coupling of energy and signal transduction"; arXiv.org > q-bio > arXiv:1208.5673, 2012.
- [37] Iliff, J.J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B.A., Peng, W., Gundersen, G.A., Benveniste, H, Vates, G.E., Deane, R., Goldman, S.A., Nagelhus, E.A., Nedergaard, M., "A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β"; *Sci Transl Med*. 2012, vol 15, n° 4, p 147.