

CO572.
1es.
2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

24510

**"ESTUDIOS DE LA INTERACCION ENTRE LA CONCAVALINA-A
E IONES METALICOS"**

300 175p

T E S I S

Que para obtener el Grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
(QUIMICA INORGANICA)**

P r e s e n t a :

RAFAEL MORENO ESPARZA

650 QUIMICA INORGANICA

México, D. F.

1981

**TESIS CON
FALSA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

TABLA DE ABREVIATURAS.....	1
PREFACIO	2
CAPITULO I: La bioinorgánica.....	4
I.1. Introducción.....	5
I.2. Importancia de los iones metálicos.....	9
I.3. El papel de los iones metálicos en los sistemas biológicos...11	
I.4. Caracterización de la función del metal.....	12
CAPITULO II: Las proteínas.....	18
II.1. Las funciones de las proteínas.....	19
II.2. La composición de las proteínas.....	21
II.3. La estructura de las proteínas.....	21
II.4. Las propiedades de las proteínas.....	27
II.5. Comportamiento de las proteínas.....	30
CAPITULO III: Las proteínas metálicas.....	34
III.1. Introducción.....	35
III.2. El enlace metal proteína.....	38
III.3. El estudio de las proteínas metálicas.....	40
CAPITULO IV: El método de stopped flow.....	63
IV.1. Introducción.....	64
IV.2. El aparato de stopped flow.....	67
IV.3. Métodos de monitoreo acoplables.....	77
CAPITULO V: Las lectinas.....	80
V.1. Reseña histórica.....	81
V.2. Propiedades, importancia y usos.....	83

V.3. La concanavalina-A	86
CAPITULO VI: Parte experimental.....	114
VI.1. Antecedentes.....	115
VI.2. Diseño del experimento.....	123
VI.3. Descripción de las etapas experimentales.....	125
VI.4. Reactivos y aparatos utilizados.....	131
CAPITULO VII: Resultados y discusión.....	132
VII.1. Introducción.....	133
VII.2. El mecanismo propuesto.....	133
VII.3. Análisis de los resultados.....	140
VII.4. Tratamiento de las constantes de equilibrio.....	155
VII.5. Análisis de las constantes de velocidad.....	158
VII.6. Conclusiones.....	166
BIBLIOGRAFIA.....	169
REFERENCIAS.....	171

TABLA DE ABREVIATURAS

Se ha intentado presentar una nomenclatura consistente con la de la literatura. Sin embargo ésto puede conducir al lector a cierta confusión. Por ello, se hace aquí una pequeña tabla que muestra algunas de las abreviaturas más usadas a lo largo del trabajo, con su significado.

$|\alpha|$ =ángulo de la rotación de la luz polarizada.

α =isomería de la estructura proteica

α =isomería de los sacáridos

β =isomería de la estructura proteica

β =isomería de los sacáridos

β_i =constantes de estabilidad globales

ϵ =coeficiente de extinción molar

λ =longitud de onda.

τ =tiempo de relajación

K_i = constantes de estabilidad

EDTA =ácido etilendiamintetraacético.

Con-A =Concanavalina-A nativa

apo-Con-A =Concanavalina-A desmetalizada

p-nitro- ϕ - α -D-man = paranitrofenilalfadextromanopiranososa.

me- α -D-man =4metil- α -dextromanopiranososa

MUM =Metil-umbeliferil- α -D-manopiranososa

Prefacio

El presente trabajo consta básicamente de 2 partes. Cada una de éstas describe, al menos en parte, los intereses de su autor, a saber:

1°) El trabajo con los compuestos de coordinación en el marco de la Bioinorgánica, comprendido en los capítulos I a III.

2°) El trabajo en particular respecto a la cinética y los mecanismos de reacción que gobiernan las interacciones entre los iones metálicos y en este caso, una proteína en particular: la concavalina A. Lo anterior queda comprendido en los capítulos IV a VII.

Por otra parte, a continuación se hace una descripción de los contenidos de cada capítulo, con objeto de hacer explícito el motivo de la organización de este trabajo.

El primer capítulo expone la relevancia de la Bioinorgánica, en términos de la importancia que tienen los compuestos que forman los sistemas biológicos con especies conocidas como inorgánicas.

El segundo capítulo intenta mostrar en forma resumida las características y las propiedades de las proteínas.

El tercer capítulo explica cuáles son las interacciones entre los iones metálicos y los sistemas biológicos en general y las proteínas en particular. A la vez, se indica cuales son los métodos utilizados en el

estudio de la interacción metal-proteína.

El capítulo cuarto habla de una técnica específica para el estudio de las velocidades de reacción. Esta técnica es utilizada en el trabajo experimental.

El capítulo quinto reseña brevemente la clase de proteínas, a la cual pertenece la proteína utilizada para la medición de las velocidades de reacción, en su interacción con varios iones metálicos. Y al final del capítulo se reseñan las propiedades de mayor importancia de esta proteína.

El capítulo sexto aborda el trabajo experimental. Desde el diseño del experimento, hasta la explicación de cada una de las etapas experimentales.

Finalmente en el séptimo capítulo representan los resultados y se discute el mecanismo propuesto, dejando al final las conclusiones obtenidas del desarrollo experimental.

CAPITULO I

LA BIOINORGANICA

CAPITULO I

1) INTRODUCCION

Durante los últimos 20 años se ha producido un notabilísimo incremento en el conocimiento de las interacciones de los iones metálicos con los sistemas vivos, encontrándose que la importancia del papel que estos juegan en un gran número de procesos biológicos es incuestionable.

Este incremento, tanto en el conocimiento de los fenómenos que ocurren entre los iones metálicos y los sistemas vivos propiamente, como la misma noción de su importancia, surge a través del desarrollo paralelo de dos factores:

1° El enorme avance del marco teórico de la química inorgánica así como de la tecnología que sustenta éste.

2° La consolidación del trabajo multidisciplinario en las áreas de la bioquímica y de la química inorgánica, dando como consecuencia la creación de una nueva área de conocimiento, que dependiendo de los autores toma el nombre de bioinorgánica o también de bioquímica inorgánica.

Ahora bien, los requerimientos de los sistemas vivos por iones metálicos es muy variado pero puede considerarse que existen en general dos grandes grupos de procesos biológicos en relación a sus necesidades de iones metálicos estos son:

Los sistemas o procesos que requieren no solo un elemento en particular sino un ion de éste elemento en un estado de oxidación específico el cual es el único que puede cumplir con los requisitos, ya estructurales, ya catalíticos del sistema; y por otra parte los sistemas o procesos en los que puede efectuarse el intercambio de un ión metálico por otro similar sin que ello involucre cambios muy importantes en el sistema o proceso en cuestión.

La presencia de los iones metálicos en los sistemas biológicos puede mostrarse en toda su importancia a través de casi todas las llamadas "ciencias de la vida", en donde, el aumento en la comprensión de cada uno de los fenómenos estudiados por éstas, hace que cada vez sea mayor la necesidad de tener una idea clara de la interacción entre los iones metálicos y los procesos biológicos; con objeto de completar el esquema de acción del proceso estudiado^{2}.

Así, en los estudios de estos procesos desde el punto de vista de la bioquímica es necesario tomar en cuenta los metales como el Fe^{2+} el cual, actúa en reacciones tan importantes como las de óxido-reducción o bien de transferencia de grupos. También también se pueden encontrar otros iones metálicos como el Zn^{2+} , sin el cual serian imposibles reacciones como la descarboxilación, algunos procesos hidrolíticos o aun algunas reacciones de catálisis ácida. Además de lo anterior, los iones metálicos también se encuentran involucrados en algunos de los complejos proteínicos cuya función es almacenar, transportar y controlar la con---

centración de iones para su incorporación en los sistemas enzimáticos adecuados⁽⁸⁾.

Por otra parte desde el punto de vista de la fisiología es necesario explicar el mecanismo del impulso nervioso, en términos de la presencia de iones tales como el Ca^{2+} .

Finalmente, en el campo de los estudios citológicos es muy conocido el caso de la llamada bomba de K^+ / Na^+ en donde, son estos dos metales los que controlan las funciones de la pared celular.

Ahora bien, es evidente que los metales mencionados no son sino una parte del total de los metales involucrados en los procesos y sistemas biológicos de la naturaleza. Así, aún cuando, el Na^+ , el K^+ , el Mg^{2+} y el Ca^{2+} son los metales más importantes en estos sistemas desde el punto de vista cuantitativo⁽⁴⁾, ya que están presentes en mucho mayor concentración que todos los demás iones metálicos, existen una gran cantidad de éstos que a pesar de encontrarse en mucho menor concentración que los cuatro mencionados anteriormente, cumplen con una serie de funciones de importancia fundamental. Una idea aproximada de las proporciones existentes entre los iones metálicos en los sistemas vivos, la puede dar el siguiente hecho: el 99% del contenido metálico en el cuerpo humano lo constituyen los cuatro iones metálicos mencionados anteriormente^(1,2). La tabla siguiente muestra a su vez cuál es la constitución aproximada de la biosfera con respecto a cada uno de los elementos:

TABLA I {1}

H																He	
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	S	P	Cl	Ar	
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	Sb	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	La	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi			

ELEMENTOS QUE SE ENCUENTRAN EN LA BIOSFERA (ABUNDANCIA)

□ 1-60%

○ 0.05-1%

△ Menor que 0.05%

2) IMPORTANCIA DE LOS IONES METALICOS

Para poder comprender en toda su magnitud la importancia tanto de los iones metálicos en sí, como del estudio de sus funciones e interacciones, conviene mencionar algunos de los ejemplos más comunes, de los fenómenos que ocurren cuando se presenta la deficiencia o el exceso de alguno de los iones metálicos mencionados. El primero de estos ejemplos y quizá de los más conocidos es el de la anemia, consiste esencialmente en una deficiencia de Fe en el organismo. Esta deficiencia conlleva un contenido menor de hemoglobina en las células sanguíneas y por tanto a la decadencia del organismo afectado hasta su eventual destrucción.

Por otra parte cuando el mismo elemento se presenta en exceso en un organismo, lleva a la condición conocida con el nombre de siderosis. También, se tiene que, ante la deficiencia de Co, se presenta para el organismo la condición llamada anemia perniciosa. Como los ejemplos anteriores existen otros muchos que muestran la importancia de los iones metálicos en los sistemas biológicos ^{2,1} .

Así, dada la importancia de los iones en los organismos vivos, es conveniente discutir acerca de la manera en que se pueden estudiar las interacciones entre los propios iones y los sistemas biológicos.

Considerando que este estudio involucra varias ramas de la ciencia, será necesario que se le ataque de forma multidisciplinaria, de tal manera que pueda comprenderse cada fenómeno dentro de su contexto completo.

Es evidente que dependiendo del bagaje académico que cada científico tuviese al enfrentarse a alguno de estos problemas, enfocará el problema de diferente manera.

De lo anterior puede concluirse, cual será el tipo de estudios en los que el químico inorgánico puede involucrarse.

De los diferentes campos abiertos en la bioinorgánica que más asequibilidad presentan para el químico inorgánico deben mencionarse los siguientes:

1° El estudio de la interacción metal-biomolécula propiamente, esto es, el estudio de las biomoléculas que por su función tienen contacto con iones metálicos de alguna clase^{3,8}.

2° El estudio de las interacciones surgidas ante la presencia de iones metálicos en sistemas que no necesariamente actúan con ellos^{6}.

3° El estudio de compuestos simples que tengan alguna o algunas similitudes con las biomoléculas en presencia de iones metálicos, con objeto de comprender el sistema más simple para posteriormente, poder extrapolar a los sistemas biológicos complejos^{2,5}.

Así se tiene, que la mera presencia de iones metálicos tiene ciertas ventajas para el estudio de los sistemas biológicos, ya que por sus propiedades se puede determinar y obtener información de estos sistemas, es decir que, propiedades tales como la reactividad química

o la estructura electrónica, permiten utilizar una gran variedad de técnicas instrumentales muy poderosas que pueden resolver una gran cantidad de incógnitas que se presentan durante el estudio de las biomoléculas. A la vez, el hecho de existir un ión metálico en un sistema biológico provee de un guía adicional para la comprensión y elucidación de los mecanismos de la acción biológica. Además, se puede obtener información acerca de la configuración del sistema, a través de la correlación entre la especificidad del mismo y los datos que se tienen acerca de la reactividad de los iones metálicos frente a diversos sustratos reactivos.

3) EL PAPEL DE LOS IONES METALICOS EN LOS SISTEMAS BIOLOGICOS.

Como ya se ha indicado en los párrafos anteriores, los iones metálicos pueden cumplir con una gran cantidad y variedad de funciones en los sistemas biológicos. Ahora bien, al parecer existe una cierta relación entre la función que cumple el metal y la fuerza de enlace con la cual se encuentra unido al sistema en el que actúa. Es obvio que lo anterior no es una regla, pero sin embargo es razonable y además puede explicarse cualitativamente.

Así, se tiene, que para los iones cuya unión con el sistema en el que actúan es débil, se puede esperar que sean capaces de transportarse desde y hacia los sitios en que sean requeridos, por las necesidades del sistema. Lo anterior se explica fácilmente con base en la fuerza de unión del metal al entorno ya que la pequeña barrera de potencial repre

sentada por una unión débil será fácilmente vencida simplemente por un gradiente en la concentración del metal. Entonces, los iones metálicos pequeños, poco cargados y poco afines a coordinarse serán los que presenten menor interacción ante el entorno que los rodea y por tanto, podrán estar involucrados en los sistemas que requieren del transporte de carga o masa.

Ahora bien, aquellos iones cuya afinidad por algún sistema o parte de éste sea mayor, presentándose ésta por factores tales como: tener un valor de carga grande o gran capacidad de coordinación, serán no solo difíciles de transportar sino que producirán cambios en el entorno y aún más, formarán sistemas tan estables que resulte imposible separarlos sin antes destruirlo.

Lo anterior implica que algunas de las propiedades del metal se vean modificadas, ya que la interacción entre éste y el sistema en el que actúa debe considerarse retroalimentada, esto es, el metal afecta con su presencia al sistema y el sistema afecta al primero, conforme mayor sea la interacción que éste tiene con aquel.^{2}

4) CARACTERIZACION DE LA FUNCION DEL METAL

Ahora bien, con base en lo anterior se puede intentar hacer una clasificación de las diferentes funciones de los metales en los sistemas biológicos donde se contemplen estos hechos. Con objeto de hacer

esta clasificación lo más clara posible, es conveniente especificar la función con un ejemplo ilustrativo en cada caso. Para ello se mostrará un tabla con los diferentes tipos de función y a continuación se hará un breve esbozo de las características del enlace con un ejemplo que ilustre la función.

TABLA II^{2}

Correlación entre la función del metal y la fuerza de unión

- a) Mecanismos de control y disparo
- b) Influencia estructural
- c) Sistemas ácido-base
- d) Sistemas redox

Como puede verse en la tabla anterior existen cuatro tipos de interacción propuesta, en orden creciente de la fuerza de unión del enlace metal-sistema. Y como ya se ha indicado se reseñarán las propiedades de cada uno de los sistemas con un ejemplo, que muestre cada uno de los tipos de interacción.

a) Los sistemas de control y de disparo:

Se debe esperar encontrar iones metálicos pequeños y de carga también pequeña tales como el Na^+ , el K^+ , el Mg^{2+} o el Ca^{2+} ; su presencia implica que el entorno no se verá muy afectado por la presencia del ión y por ello tendrá la capacidad para moverse, de tal manera que podrá ser

transportado con facilidad ante un mero gradiente de concentración. Aunado a lo anterior, el pequeño tamaño del ión, permite tener una gran permeabilidad frente a la mayoría de las membranas biológicas. Un ejemplo típico de los iones que tienen esta función son el Na^+ y el K^+ en la llamada "bomba de sodio y potasio", la cual se presenta como un proceso en el cual existe transferencia de materia a través de una membrana semipermeable (la pared celular) como respuesta a gradientes de la concentración. Otro ejemplo de gran importancia de esta misma clase de función es el que corresponde a la transmisión del impulso nervioso, proceso en el cual el Ca^{2+} , puede unirse tanto a los fosfatos de los carbohidratos, como a ciertas proteínas de la pared celular. Aún cuando el proceso de neurotransmisión no se ha logrado determinar de manera exacta, se pueden encontrar las características antes indicadas ^{1,2,4}.

b) Las influencias estructurales:

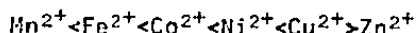
La formación de complejos entre ciertos iones metálicos y algunas proteínas tiene como consecuencia que ciertas configuraciones de las proteínas mencionadas queden estabilizadas de manera tal que tanto sus propiedades fisicoquímicas como biológicas se vean modificadas. Así, iones como Ca^{2+} , Mg^{2+} , o Mn^{2+} , pueden influir sobre una cantidad de proteínas, produciendo cambios conformacionales reversibles entre la proteína desmetalizada que generalmente es inactiva y la proteína nativa y por tanto activa. La función más simple para los iones metálicos de esta clase será la de "hormado", es decir la de producir un cambio en la estructura de la proteína que, en última instancia, le permite ejercer su función. También puede ocurrir que el ión metálico forme parte del sitio activo

del sistema y ahora su acción sea la de acercar el sustrato a la proteína para que se produzca la reacción. Ejemplos de estos tipos de comportamiento, se pueden observar en los siguientes casos: Al parecer los iones Mn^{2+} y Ca^{2+} afectan la estructura y la función de los ácidos nucleicos y aún la de los nucleótidos en la estabilización de la doble hélice. También son estos dos metales los que actúan en la concanavalina produciendo el cambio en la conformación de la proteína que conlleva a la formación del sitio activo. Otro caso es el de la carboxipeptidasa-A que actúa a través de un ión divalente el cual tiene la función de atraer al sustrato y orientarlo para producir la descarboxilación, este ión es el Zn^{2+} {1,2,3,8}.

c) Comportamiento ácido-base:

Tomando en cuenta que los iones metálicos pueden aceptar pares electrónicos y así actuar como ácidos de Lewis, puede esperarse que presenten un comportamiento diferente en principio, al que puede presentar el ión hidrógeno frente a cualquier sustrato. Es evidente que cada ión metálico presentará un comportamiento de fuerza ácida diferente relativo a los demás iones metálicos frente a los sustratos en cuestión. Ahora bien, el orden en que la fuerza ácida de los iones metálicos varía se puede sistematizar en términos de varios factores, a saber: tamaño del ión, carga del mismo y finalmente un factor que debe ser considerado cuando se habla de elementos de transición y que es el de su capacidad de coordinación. Así por ejemplo se tiene que para los iones de la 1^a serie de transición la capacidad de coordinación está determinada por la estabilización del campo cristalino, el cual, es producido por

el arreglo y el tipo de ligantes unidos al metal. El orden de variación de la fuerza ácida de estos iones para un arreglo octaédrico y para una multitud de ligantes usados es el siguiente^[9]:



Este orden se observa para la mayoría de las reacciones que involucran catálisis ácida en donde el ión participante es un ácido de Lewis. Sin embargo, este orden no se mantiene constante en todas las reacciones pero el hecho de que cambie es muy significativo y puede dar una gran cantidad de indicios acerca del sistema en donde ocurre el cambio mencionado.

d) Comportamiento redox:

Un campo por sí mismo es el estudio de las reacciones redox en los sistemas biológicos. Este proceso casi siempre tiene involucrado al menos un ión metálico, el cual, cataliza el cambio en la valencia del substrato a través de un cambio en su estado de oxidación. En este tipo de sistemas la afinidad que presenta el entorno por el ión metálico es mucho mayor que en los casos anteriores y se observa que cuando se trata de desplazar al ión del sistema, es necesario utilizar condiciones tan severas que el este queda desnaturalizado irreversiblemente antes de perder al metal. Una característica muy importante de estos sistemas es la estereoquímica asociada al ión metálico la cual es extremadamente irregular y generalmente muy apartada de los tipos de simetría que tienen los compuestos de coordinación del metal en cuestión. Esta

aparente anomalía es muy útil al explicar la función del sistema, pues los potenciales de óxido-reducción se ven seriamente afectados con este tipo de irregularidades en el entorno del metal. Los metales más importantes en este tipo de sistemas son Fe, Co, Cu y Mo. En general, los metales involucrados tienen funciones que van desde la transferencia simple de electrones hasta la incorporación de moléculas como el oxígeno o la de grupos cargados como el radical OH^{\cdot} ^{1,2,3,5,7}.

Con lo anterior, se muestra cual es la importancia tanto de los iones metálicos en sí, como de la necesidad de su estudio y por tanto la importancia que tiene la bioinorgánica queda tácitamente incluida en la discusión.

CAPITULO II

LAS PROTEINAS

CAPITULO II

1) LAS FUNCIONES DE LAS PROTEINAS

Si se toma en consideración la extraordinaria complejidad de las proteínas, debido a su tamaño, es decir, la gran cantidad de posibles combinaciones que pueden surgir de las especies que las constituyen, es de esperarse que exista la necesidad de efectuar su estudio desde una serie de puntos de vista que permita a la larga la comprensión cabal de estos compuestos.

El primer enfoque que puede utilizarse para este estudio es el que usa como parámetro principal, la función de la proteína en el organismo en que él que actúa. Con ello, desafortunadamente, una gran cantidad de características se pasan por alto ya que, se ha observado que a pesar de que dos proteínas tengan la misma función en dos organismos cualesquiera, las diferencias estructurales presentadas por ambas proteínas son muy grandes. Sin embargo, aún cuando este tipo de clasificación es muy general resulta útil. En la tabla III se muestran las funciones de las proteínas y los nombres con los que se les conoce. Como ya se ha dicho este tipo de clasificación no representa un gran avance en el conocimiento de las características de las proteínas, aunque sí permite tener una primera aproximación a la reactividad de las mismas.

TABLA III⁽¹⁰⁾

Clasificación de las proteínas por medio de su función.

	NOMBRE	FUNCION
I)	Hormonas	Normadoras de algunos procesos
II)	Anticuerpos	Protección .
III)	Antígenos	Ataque e invasión
IV)	Componentes virales	Aislamiento
V)	Toxinas	Venenos, mecanismos de defensa-alimentación
VI)	Componentes musculares.	Acción-protección
VII)	Enzimas	Catálisis
VIII)	Reguladores	Control de pH, presión osmótica, etc.

2) LA COMPOSICION DE LAS PROTEINAS

Otra clasificación de las proteínas, que es aún más general pero que permite iniciar el estudio de la estructura, estaría dada en términos de la o las clases de compuestos, que pueden ser encontrados como resultado de una hidrólisis completa de la proteína. Se ha observado que ante este tipo de tratamiento todas las proteínas presentan básicamente dos clases de compuestos. Primeramente se tienen a los α -aminoácidos, los cuales se encuentran sistemáticamente en todas las proteínas, sin excepción. Por otro lado se ha observado también que en algunos casos se presentan a la vez algunos compuestos ya orgánicos, ya inorgánicos. Lo anterior permite hacer una clasificación de las proteínas en términos de su composición esto es:

i) Proteínas no conjugadas: son aquellas que están constituidas solamente por α -aminoácidos.

ii) Proteínas conjugadas: son aquellas que además de estar constituidas por α -aminoácidos tienen un grupo orgánico o inorgánico el cual recibe el nombre de grupo prostético o cofactor.

3) LA ESTRUCTURA DE LAS PROTEINAS

Ahora bien, en vista de que toda la clasificación presenta algunos defectos, se hace necesario estudiar a las proteínas desde el punto de vista estructural, con el objeto de poder comprender mejor tanto los pro

cesos, como los mecanismos de participación de las mismas. Como todas las proteínas constan esencialmente de α -aminoácidos, los cuales son las especies químicas que se identifican como las unidades mínimas; resulta evidente que el primer problema a resolver será el de conocer la manera en que los α -aminoácidos se unen para formar a la proteína.

La Estructura Primaria de las Proteínas.

Para poder iniciar la discusión acerca de la manera en que se unen los α -aminoácidos, debe considerarse lo siguiente:

i) La síntesis de las proteínas involucra a solamente 20 de los 120 α -aminoácidos naturales que existen.

ii) Esta síntesis ocurre a través de un proceso biológico de polimerización, el cual es dictado por el código genético de cada organismo en particular.

iii) El proceso mencionado, consta básicamente, de una reacción entre el radical carboxilo de un α -aminoácido y el radical amino de otro para dar como resultado, por medio de la pérdida de una molécula de agua, a la unión que comunmente se conoce con el nombre de enlace peptídico.

iv) Dependiendo de las particularidades de cada uno de los α -aminoácidos que van formando este enlace y en virtud de las características del mismo enlace, los α -aminoácidos adquieren la configuración "trans" los unos con respecto a los otros, pues ésta es la configura-

ción de menor energía para la cadena polipeptídica. Véase figura 1⁽¹¹⁾.

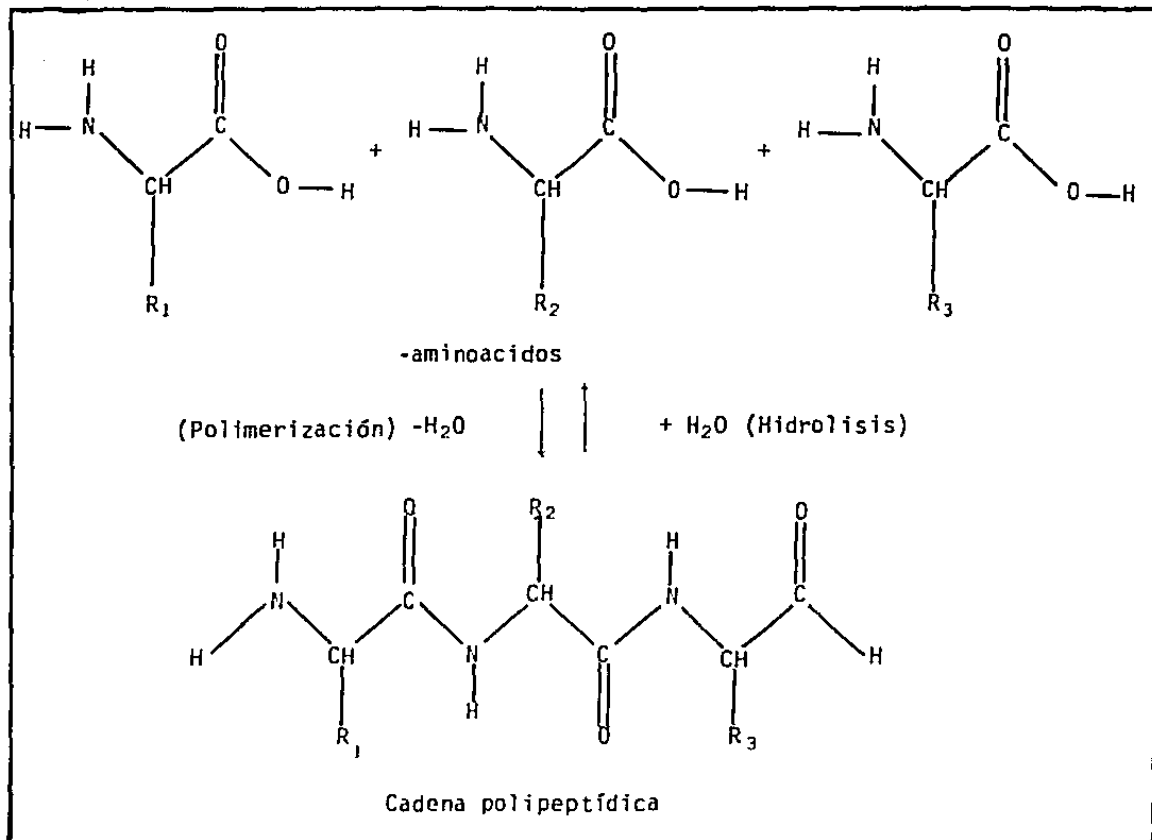


Figura 1: Formación de la cadena polipeptídica y disposición trans de la misma

Tomándose en consideración lo anterior se puede concluir lo siguiente: la diferencia primordial entre una proteína y otra reside fundamentalmente en la secuencia de α -aminoácidos que las constituyen. De hecho, debido a que el enlace peptídico entre todos los α -aminoácidos es básicamente el mismo, la diferencia residirá en los diferentes grupos unidos a los α -aminoácidos, conociéndose a estos grupos como resi-

dos aminoácidos, y en forma aislada, como cadena lateral de la proteína en su conjunto. Véase figura 1.

Ahora bien, en vista de que cada proteína tiene una secuencia diferente de α -aminoácidos y dadas las características del enlace peptídico, se observa que cada proteína tiene dos rasgos estructurales que las diferencian unas de otras, a saber: la secuencia de α -aminoácidos propiamente, la cual varía de una proteína a otra y la conformación que adquiere debido a las repulsiones entre los residuos. A estos dos rasgos estructurales, se les conoce como estructura primaria de las proteínas.

Estructura Secundaria de las Proteínas.

Una vez que una proteína se ha sintetizado, resulta evidente que la configuración fluctuará de tal manera que, dependiendo del número y la secuencia de α -aminoácidos que se han unido, se obtengan los estados de menor energía potencial para el sistema en cuestión. De esta manera se observa que las interacciones que pueden surgir para una cadena polipeptídica pueden considerarse esencialmente de dos tipos: interacciones intermoleculares e interacciones intramoleculares. Dependiendo de cuál de estas dos clases de interacción ocurre en mayor extensión se podrá tener dos clases de configuraciones. Así, si la interacción es intramolecular, es decir, que los α -aminoácidos que interactúan de manera atractiva pertenecen a la misma cadena polipeptídica y se localizan próximos uno del otro, se tiene como resultado un doblez en la cadena obteniéndose la

que se conoce como estructura de α -hélice. Ver figura 2^[12]. Por otro lado, si la interacción es intermolecular, es decir, que una cadena polipeptídica actúa sobre otra produciendo un alineamiento de las cadenas dando lugar a la llamada estructura de capas. A este tipo de arreglo molecular de las proteínas se le conoce con el nombre de estructura secundaria.

Estructura Terciaria de las Proteínas.

Dado el gran tamaño de las proteínas es razonable esperar otro tipo de interacciones además de las ya mencionadas. Y si se consideran los residuos correspondientes a los 20 α -aminoácidos esenciales se puede observar que fundamentalmente presentan cuatro clases de interacciones posibles, las cuales se muestran a continuación, en orden decreciente de la energía asociada a cada una de ellas:

Interacción covalente.

Interacción iónica o puente salino.

Interacción de puente de hidrógeno.

Interacción de Van der Waals.

Las interacciones mencionadas se producirán en cada molécula de proteína dependiendo si existen o no las siguientes clases de residuos: para el caso de la interacción covalente debe existir azufre de residuos cisteínicos. Para la interacción iónica deben de existir grupos ionizables de cargas opuestas. Para la interacción de puente de hidrógeno deben existir grupos muy polares e hidrógenos disponibles. Finalmente, para

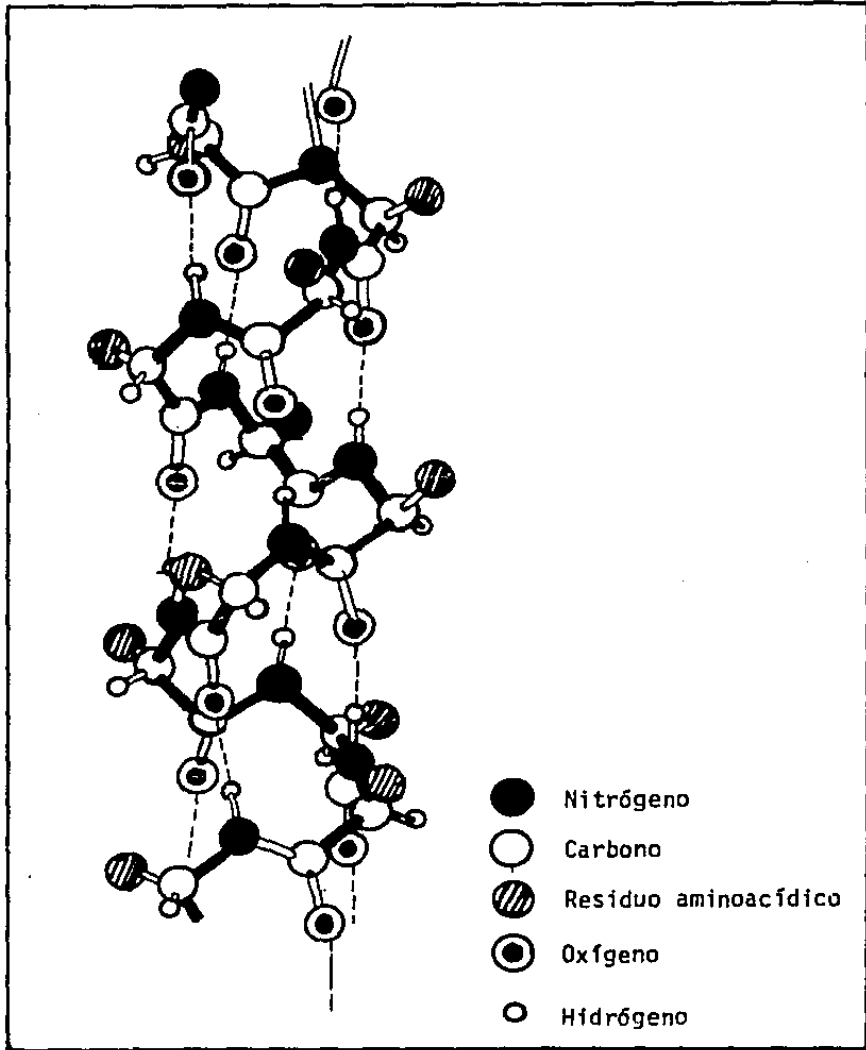


FIGURA 2

la interacción de Van der Waals se requiere la presencia de residuos que no puedan ionizarse y sean poco polares, que por su similitud puedan interaccionar activamente. Todas las interacciones mencionadas dan como resultado que la proteína se doble de tal manera, que se produzca una conformación particular para cada proteína dependiendo de las características de la cadena lateral de la proteína. A esta conformación estructural se le conoce con el nombre de estructura terciaria de las proteínas.

Estructura Cuaternaria de las Proteínas.

Finalmente, se tiene que algunas de las proteínas que se han estudiado presentan varias unidades peptídicas con un arreglo particular que generalmente está acoplado por un sistema externo, a las cadenas proteínicas. A este tipo de arreglo se le conoce con el nombre de estructura cuaternaria de las proteínas.

4) LAS PROPIEDADES DE LAS PROTEINAS

Las proteínas, por sus características, tienen una serie de propiedades que deben estudiarse a profundidad.

Considerando la estructura y el gran tamaño de las proteínas deben considerarse básicamente las siguientes propiedades para su estudio:

- a) Solubilidad
- b) Densidad de carga

- c) Distribución de carga
- d) Capacidad de hidratación
- e) Forma
- f) Tamaño
- g) Sitios reactivos

a) Solubilidad: En general se tiene que una proteína puede disolverse en agua para dar soluciones coloidales. Esta disolución se presenta como resultado de la gran cantidad de grupos ionizables o muy polares que, al interactuar con las moléculas de agua, producen que éstas se coordinen de manera tal que, al interaccionar las moléculas de agua restantes con las moléculas ya coordinadas, la proteína puede pasar a formar parte del seno del disolvente. Naturalmente una proteína será más o menos soluble en agua dependiendo del número de grupos ionizables o polares que tuviese.

b) Densidad de carga y c) Distribución de carga: Cuando una proteína se disuelve en agua desionizada, los grupos ionizables podrán ionizarse y se tendrá en solución igual número de cargas positivas (iones hidrógeno) que de cargas negativas (los grupos correspondientes en la cadena lateral de la proteína disuelta). El fenómeno anterior dependerá de las constantes de disociación ácida de los grupos que componen la cadena lateral de la proteína en cuestión. El pH así obtenido en solución acuosa se le conoce como punto isoiónico de la proteína. Ahora bien cuando se hace un cambio al pH de la solución el número de grupos ionizados de una carga es mayor que el de la otra. Es evidente enton-

ces que del pH obtenido en una solución de estos compuestos dependerá de la densidad de carga de estos. Por otra parte, la distribución de la carga tendrá varios efectos en una proteína, entre los cuales, se deben mencionar tanto su comportamiento frente a un campo eléctrico externo, como su capacidad de actuar como surfactantes. Por otra parte, se tiene que cuando a una solución acuosa de alguna proteína se le hace que disminuya la constante dieléctrica manteniendo la fuerza iónica constante, las moléculas de la proteína se acercarán formando aglomerados que causarán a la larga la precipitación de la misma. Otro efecto causado por este tipo de propiedades de carga es el de precipitación de una proteína cuando se añade a la solución alguna sal iónica de metales pesados.

d) Capacidad de hidratación: Como ya se ha indicado, las proteínas tienen una gran capacidad de hidratación. En general se observa que una proteína puede tener entre 2g y 5g de agua por cada 10 g de proteína. Esta capacidad dependerá del número de grupos polares y ionizables que contuviese la proteína en cuestión. Es razonable esperar que, cuando a una proteína se le elimina el agua, la variación del entorno produce un cambio interno en la conformación de la proteína. Ello ocurre porque cuando ésta pierde agua, los grupos polares pierden la protección que se ejercía sobre ellos, de tal manera que ahora interactúan unos con otros. Como la interacción de los grupos polares es mucho mayor en magnitud que la de los grupos no polares (interacción de Van der Waals vs. interacción de dipolo-dipolo) ello produce una rotación interna de manera que los grupos no polares pasan a la esfera externa de la proteína, la cual es la configuración contraria a la proteína en solución.

e) Forma: Generalmente se observan una gran cantidad de posibles formas para las proteínas, las cuales pueden determinarse generalmente a través de los rayos-X. Sin embargo, debido al tremendo trabajo que ésta técnica involucra, es preciso efectuar una determinación de la forma primera aproximación, ésta se hace a través del uso de técnicas de electroforésis que lo permiten.

f) Tamaño: Los tamaños observados en las proteínas son muy variables, en general se expresan en miles de unidades atómicas.

h) Grupos reactivos: Dependiendo de la, o las, funciones que tenga una proteína, se podrá observar uno o varios grupos reactivos con una gran selectividad para determinados sustratos. Así, una vez que se conoce qué tipo de sitio reactivo tiene una proteína, resulta relativamente fácil separar una mezcla que tenga, además de otras cosas una o más proteínas, por medio del uso de algunas resinas, las cuales tienen unidos grupos que son semejantes al sustrato con el que reacciona la proteína. Esto permite que la resina tenga una afinidad muy grande para la proteína que se desea separar.

5) COMPORTAMIENTO DE LAS PROTEINAS

En general se ha observado que la mayoría de las proteínas presentan similitudes en su comportamiento frente a ciertas variaciones del medio que las rodea. Así, se tendrá que los factores que pueden variar se en una solución de proteínas son esencialmente los siguientes:

- a) El pH
- b) La constante dieléctrica
- c) La fuerza iónica

A continuación se describe de manera breve cual es el comportamiento general de las proteínas frente a la variación de cada uno de los factores antes mencionados.

a) Variación del pH: En general cuando se varía el pH de una solución cambia la concentración del ión hidronio (H_3O^+) o del ión hidroxilo (OH^-), los cuales son dos radicales ionizantes. Conforme aumenta la concentración de alguno de éstos, dependiendo de la fuerza ácida del medio con el que interactúan, estos iones atacarán al medio ionizándolo. Así cuando el medio citado contiene una proteína, ésta comenzará a ionizarse dependiendo de las constantes de estabilidad de los grupos ácidos o básicos de ésta. Al ionizarse, la carga de la proteína aumentará, de tal forma que su solubilidad aumentará consecuentemente. Entonces cuando el pH de la solución está por encima del pH del funcionamiento óptimo, la solubilidad aumenta también. Otra propiedad que varía con el pH, puede ser la reactividad de la proteína, la cual depende de que la proteína tenga, o no, desocupados y ionizados los sitios reactivos. Como en el caso de la solubilidad, existe un pH de máxima actividad o funcionamiento óptimo, de manera que cuando el pH de la solución aumenta o disminuye, la actividad disminuye.

Lo anterior se muestra gráficamente en la figura 3⁽¹⁹⁾.

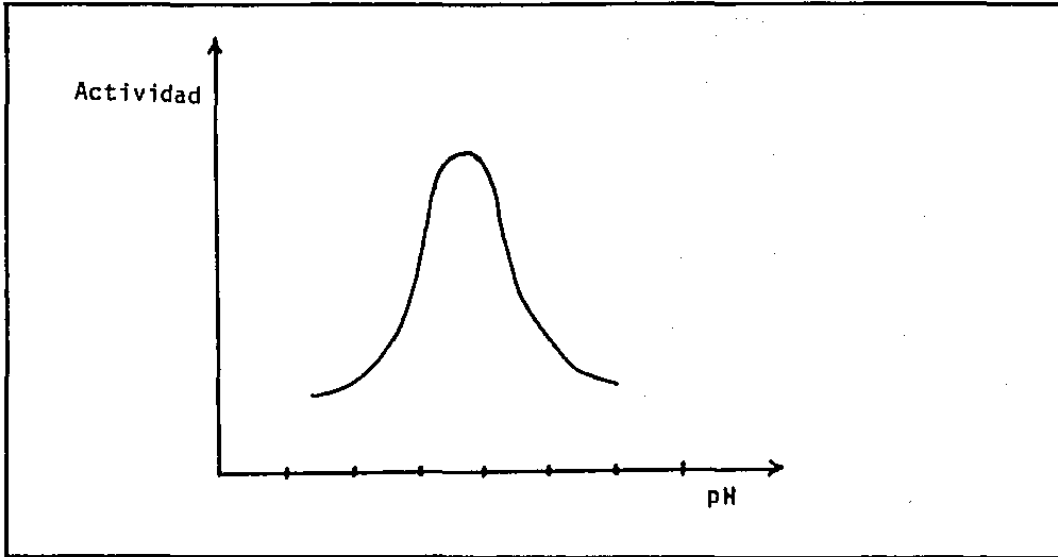


Figura 3: Variación de la actividad de una proteína con el pH

b) Variación de la constante dieléctrica: Puede considerarse que la interacción entre dos cargas puede describirse como:

$$F = \frac{Z^- Z^+ e^2}{D r^2}$$

en donde Z^- y Z^+ son la magnitud de las cargas negativa y positiva respectivamente, e^2 es la carga del electrón, r^2 la distancia que separa a las cargas y finalmente D es la constante dieléctrica del medio en el que está el sistema. Entonces, cuando la constante dieléctrica del

medio aumenta, el valor de la interacción disminuye con lo cual puede lograrse que la solubilidad de la proteína aumente. Contrariamente, cuando la constante dieléctrica del medio disminuye, el valor de la interacción aumenta con lo cual la proteína puede precipitarse. Lógicamente se espera que cuando se mezcla una solución de proteínas con algún solvente de baja constante dieléctrica, la proteína precipite.

c) Variación de la fuerza iónica: Se ha observado que cuando una proteína se disuelve en agua, la cantidad de proteína disuelta variará dependiendo de la fuerza iónica de la solución. Esta variación puede racionalizarse en la siguiente fórmula:

$$\log S = \beta K_S I$$

donde S es la solubilidad de la proteína, β es la solubilidad de ésta a dilución infinita, K_S es una constante de proporcionalidad que indica el grado de solubilidad de la proteína y se conoce como constante de solubilidad e I es la fuerza iónica. Ahora bien, cuando en una solución de proteínas la fuerza iónica es pequeña, la sal con la que se ajustó el valor de la fuerza iónica actúa primeramente sobre los dipolos y cargas de la proteína situándose de forma tal, que la interacción sea máxima, esto es cubriendo a la proteína, incrementando así la solubilidad de ésta. Por otro lado, los iones también actúan sobre las moléculas de agua, orientando dipolos, provocando con ello la separación de las moléculas de la proteína. Este efecto se conoce con el nombre en inglés de "salting in". Sin embargo al aumentar la fuerza iónica y con esto la concen

tración de iones en la solución, estos producirán, al unirse a las moléculas de agua, que el número de estas, disponibles para la hidratación de la proteína, sea tan pequeño, que la solubilidad de la proteína disminuya. Cuando la concentración de iones en la solución es muy grande, éstos comenzarán a formar pares iónicos de tal manera que las moléculas de agua podrán acercarse las unas a las otras provocando al fin la precipitación de la proteína. A este efecto se le conoce con el nombre también en inglés de "salting out".

CAPITULO III

LAS PROTEINAS METALICAS

CAPITULO III

1) INTRODUCCION

Cuando se conoce la composición y al menos parte de la estructura de una proteína, se puede saber si la proteína analizada, es o no una proteína conjugada. Como ya se ha indicado en el capítulo anterior, pueden ser de dos clases, esto es, las proteínas con un grupo prostético o cofactor que es un compuesto orgánico y las proteínas que tienen un grupo prostético inorgánico⁽¹⁰⁾.

Ahora bien, cuando el cofactor de una proteína es un grupo que tiene al menos un ión metálico, se tiene lo que se conoce con el nombre de proteínas metálicas. Esta clase de proteínas puede a su vez dividirse en dos subclases, dependiendo de las características del enlace que forman el metal y la proteína. De esta manera se tiene que la primera de estas subclases tiene como características, que el enlace entre la proteína y el metal sea tan fuerte que no pueda romperse de forma reversible⁽²⁾. Esto es, si se intenta desplazar al metal del sitio que ocupa en la proteína, ésta se desnaturizará antes de perder el metal. Así, hasta la fecha, todos los intentos por sustituir el ión metálico de este tipo de proteínas ha resultado infructuoso. Lo anterior permite considerar que este tipo de proteínas tienen una altísima afinidad por el

ión metálico correspondiente. A las proteínas con estas características se les conoce con el nombre de "metaloproteínas".

Por otra parte cuando la proteína presenta mucho menor afinidad por el ión metálico y consecuentemente es relativamente fácil romper el enlace y formarlo de nuevo, es decir, el proceso de separación de la proteína y el metal es reversible, entonces dicha propiedad conlleva a una serie de consecuencias muy interesantes, entre las cuales se puede mencionar la de poder sustituir al metal original por algún otro con ciertas características que permitan estudiar el comportamiento de la proteína. Este tipo de proteínas metálicas se les conoce con el nombre de "complejos metal-proteína".

Por lo tanto, al purificar una proteína se puede conocer a cuál de las dos subclases pertenece, por medio de la determinación de la relación "metal/proteína" que tiene la solución de la proteína a través de las sucesivas purificaciones que se le vayan haciendo. De esta manera, se tendrá que cuando se purifique una metaloproteína la relación "metal/proteína" tiende a ser constante conforme aumenta la pureza de la proteína. Contrariamente en el caso de que la purificación se haga a un complejo metal-proteína la relación variará, mas o menos, dependiendo de la fuerza de enlace metal-proteína y en general no se observará constancia en éste, sino una ligera disminución, conforme más purificaciones se hagan a la proteína.

2) EL ENLACE METAL PROTEINA

En el campo del estudio de las proteínas metálicas uno de los temas de mayor importancia es el de la formación del enlace entre metal y la proteína. En general se han propuesto dos posibles caminos para ello⁽²⁾. Estos, diferirán en cuanto al lugar que ocupa el ión metálico en la síntesis proteica. Esto es, que el metal forme parte "ab initio" de esta o por lo contrario, el metal pasa a formar parte de la proteína después de que se hubiese sintetizado ésta. Es evidente que estos dos caminos no son mutuamente excluyentes y que ambos pueden ser considerados como válidos en el contexto en el que pueden usarse, esto es en el caso que la proteína metálica sea de la clase de las metaloproteínas, la primera ruta de síntesis puede explicar la gran afinidad del ión metálico con la proteína ya que el entorno producido al rededor del metal deberá ser muy estable. Lo anterior puede sostenerse en las observaciones que un número muy grande de investigadores han hecho sobre el tema del hormado metálico^(1,2,5). Por otro lado, en el caso de los complejos metal-proteína, se tiene que es el segundo camino el que permite explicar el comportamiento del enlace pues en este caso, se observa una relativa facilidad de entrada o salida del metal a la proteína tal como ocurre en la mayoría de las reacciones entre los iones metálicos y muchos de los ligantes. Esto puede esquematizarse con la siguiente reacción:



donde M es un ión metálico en el estado de oxidación n^+ y P es una proteína desmetalizada o apoproteína (en general se considera que una apoproteína es aquella, que por medio de algún tratamiento suave, ha perdido de manera reversible el cofactor correspondiente).

En el estudio de las proteínas metálicas deben hacerse una serie de consideraciones, las cuales, permitan comprender cual es la extensión del tema tanto respecto al estudio del enlace metal-proteína, como respecto a las características propias del mismo, que lo hacen diferente a la mayoría de los enlaces entre metal y ligantes más simples.

Lo anterior se puede resumir en los siguientes puntos:

En primer lugar, aún cuando existen una gran cantidad de técnicas que permiten estudiar el enlace metal-proteína directamente, no debe perderse de vista que el enlace en cuestión es mucho más complejo debido al gran número de posibles interacciones que pueden surgir entre el metal y el entorno correspondiente a la proteína. En segundo lugar, aún cuando se puedan hacer algunas simplificaciones tanto en la interpretación del enlace como en el estudio del mismo, ya con base al conocimiento que se tiene de ligantes similares a los componentes de las proteínas, ya a través de la síntesis de modelos químicos que simulen los enlaces más probables de una proteína, debe tomarse en consideración que lo anterior no son más que hipótesis simples, si bien no inútiles por completo, si incompletas y susceptibles de comprobación. Una vez que se han hecho las consideraciones anteriores es conveniente reseñar los métodos que pueden usarse en el estudio de los sistemas

bioinorgánicos en general, enfatizándose particularmente en el estudio de las proteínas metálicas.

3) EL ESTUDIO DE LAS PROTEINAS METALICAS

Además de la evidente importancia de los estudios cristalográficos de rayos-X, en cualquier tipo de definición estructural de las proteínas metálicas, es conveniente hacer una revisión de los métodos que, aunque de manera menos precisa, también dan información estructural de los compuestos en estudio y a la vez conviene estudiar los métodos que dan información diferente a la estructural. En la tabla IV se hace un resumen de los métodos que se utilizan más frecuentemente en los estudios de los sistemas con iones metálicos.

TABLA IV {2}

A) EL ESTUDIO DEL ENLACE METALICO "IN SITU"

- a) Reemplazo del ión metálico
- b) Pruebas químicas
- c) Métodos potenciométricos

B) LAS TECNICAS ESPECTROSCOPICAS

- a) U.V. - Vis - I.R. (absorción)
- b) D.O.R.- D.C.
- c) R.M.N., R.P.E. (Resonancia magnética)

C) LAS DETERMINACIONES TERMODINAMICAS

- a) Constantes de estabilidad
- b) Constantes de óxido-reducción

D) EL USO DE COMPUESTOS MODELO

- a) Hormado para la síntesis de compuestos
- b) Síntesis de complejos simples

E) DETERMINACIONES CINETICAS

- a) Del comportamiento con otros metales
- b) De la interacción metal proteína en sí.

A continuación se hará una descripción de las aplicaciones de los métodos indicados en la tabla IV con objeto de tener idea de la información que es posible recabar con cada uno de estos en el estudio del enlace metal proteína.

A) EL ESTUDIO DEL ENLACE METALICO "IN SITU"

En general, el entorno de un ión metálico en los sistemas biológicos, puede incluir varios ligantes de diferentes lugares del sistema. Este comportamiento puede entenderse en términos de la estereoquímica del sitio donde se encuentra el metal y la manera como éste reacciona con su entorno.

Para estudiar entonces, cómo reacciona un ión metálico con las proteínas se pueden utilizar las técnicas que se describen a continuación:

a) Reemplazo del metal: En general esta técnica resulta de gran utilidad para el estudio de sistemas que tienen como componente metálico un ión cuyas características hacen que su estudio sea, si no imposible, sí muy problemático. Este es el caso de todos aquellos metales que, por ejemplo, son transparentes a las técnicas espectroscópicas que permiten detectar una gran cantidad de propiedades del enlace entre el metal y su entorno y aún del mismo entorno a través de los cambios en las propiedades antes mencionadas. Esto es, para un ión metálico que resulta transparente para una técnica como la absorción en la zona del visible, resulta muy conveniente reemplazarlo por otro que sea activo, Así un metal representativo puede intercambiarse por uno de transición, el cual sí es activo en la zona del visible, de tal manera que ahora se

puede conocer cuales son los cambios que ocurren dada la interacción metal-entorno a través de los cambios de la propiedad antes mencionada. El requerimiento fundamental para el uso exitoso de esta técnica es el de que el metal original y el usado para reemplazarlo deben tener similitudes tales como: carga, radio iónico, etc., lo anterior se conoce con el nombre de reemplazo isomórfico. Una guía que indica cuan isomórfico ha sido el intercambio de iones metálicos es la de cuánta actividad original del sistema se ha perdido con el nuevo metal, siendo el caso óptimo aquel que mantiene la actividad original. A continuación se muestran algunos ejemplos (ver tabla V).

TABLA V ⁽²⁾

ION NATIVO	RADIO IONICO (nm)	ION REEMPLAZANTE (RADIO IONICO), PROPIEDAD USADA
K ⁺	0.133	Tl ⁺ (0.140), fluorescencia y NMR NH ₄ ⁺ (0.145), NMR Cs ⁺ (0.169), NMR
Mg ²⁺	0.065	Mn ²⁺ (0.080), EPR, paramagnetismo Ni ²⁺ (0.065), transiciones d-d
Ca ²⁺	0.099	Mn ²⁺ (0.080), EPR, paramagnetismo Eu ²⁺ (0.112), Mossbauer
Fe ³⁺	0.053	Gd ³⁺ (0.093), paramagnetismo Lantanidos, fluorescencia
Zn ²⁺	0.069	Co ²⁺ (0.072), transiciones d-d Otros iones de transición.

b) Pruebas químicas: El desarrollo en las técnicas analíticas para la determinación de cierto tipo de grupos en forma selectiva, permite conocer, tanto el número, como la clase de enlaces que tiene un sistema biológico con un ión metálico. El principio en el que se sustenta el método de detección química, para el estudio de las proteínas metálicas se basa en el hecho de que en las proteínas metálicas nativas el enlace metal-proteína es tan fuerte que puede impedir que reaccionen los grupos unidos al metal, mientras que en la apoproteína no existe ninguna restricción para que ocurriese la reacción. Así, cuando una proteína metálica en su forma nativa se hace reaccionar con alguno de los reactivos específicos para la detección de grupos $-SH^-$, se podrá determinar la proporción de estos relativa al peso de la proteína. Si de la misma manera se determina la proporción de estos grupos pero ahora respecto a la apoproteína, la diferencia entre ambas determinaciones indicará el número de grupos $-SH^-$ unidos directamente al ión metálico. Este método, en general puede considerarse como poco exacto pues la proporción relativa de grupos unidos al metal respecto al peso total de la proteína nativa y de la apoproteína son muy similares, lo cual trae como consecuencia errores en la interpretación ocasionados por ligeras desviaciones de los valores obtenidos experimentalmente.

c) Los métodos potenciométricos: Una forma alternativa de abordar el problema anterior es a través de la consideración de que los grupos que potencialmente son capaces de formar el enlace con el ión metálico, son bases de Lewis que en solución acuosa se comportan como bases de Brønsted. Con ello la comparación de ambas formas de la proteína me-

tálica frente a una titulación con ácido, permitirá determinar qué clase de grupos están enlazados al metal, esto es, las curvas de titulación de cada una de las formas difieren una de la otra. Lo anterior ocurre porque el pK_a de un grupo enlazado al metal es diferente a el pK_a del mismo cuando está aislado. Ahora bien, a pesar de que éste es un método muy utilizado presenta problemas, pues el número de grupos en la proteína que están involucrados en la titulación es mucho mayor que el de grupos enlazados al metal y aún cuando se puede determinar el pK_a por medio de las curvas de titulación, siempre subsiste una cierta incertidumbre⁽¹³⁾.

B) LAS TECNICAS ESPECTROSCOPICAS:

Una de las grandes ventajas propias del trabajo con moléculas que tienen iones metálicos, es la posibilidad de utilizar algunas de las propiedades intrínsecas de estos iones para discernir el comportamiento de los sistemas en los que actúan. En general, los iones metálicos presentan una gran variedad de propiedades observables a través de las técnicas espectroscópicas, las cuales se revisan a continuación.

a) Absorción U.V. - Vis. - I.R.: Se sabe que el patrón de aparición de las bandas de absorción y la intensidad de las mismas, puede dar una gran cantidad de información acerca de la unión metal-proteína. Así, se tiene que las diferencias en los espectros de absorción, tanto en la región de I.R. como en la de U.V., en las dos formas de una proteína metálica pueden utilizarse para hacer determinaciones del comporta

miento tanto cinético como termodinámico del enlace metal-proteína. Por otro lado, también la información que se puede obtener a través del espectro en la región del visible, esto es, del patrón de aparición de las bandas correspondientes a las transiciones d-d, independientemente de su uso en otro tipo de técnicas, puede elaborarse para determinar tanto la clase de ligantes unidos al ión metálico, como la estereoquímica del sitio en el que se encuentra el ión metálico. También pueden tenerse indicaciones de la longitud de enlace. Algunos ejemplos de la aplicación de estas técnicas se muestran a continuación: En la anhidrasa carbónica, una proteína que en su forma nativa tiene un ión Zn^{2+} por monómero, se ha reemplazado por Co^{2+} con objeto de determinar la estereoquímica del sitio a través del espectro en la región del visible de la proteína con este ión. Los resultados indican que el sitio es tetraédrico distorsionado. Como contraparte, se ha efectuado el mismo experimento para la piruvato-kinasa y la β -metil aspartasa las cuales muestran un entorno tetraédrico sin distorsión. Por otra parte, la eritrocuprina, que es una proteína de Cu^{2+} , muestra un espectro en el visible que indica la presencia de cuatro grupos donadores por nitrógeno rodeando al ión. Además, la intensidad de la banda observada puede atribuirse al grado de asimetría del sitio, tal como ocurre en los compuestos de este mismo metal con salicilaldehído.

b) Dispersión óptica rotatoria y dicroísmo circular: El fenómeno de dispersión óptica rotatoria, conocido por las siglas de su nombre en inglés (O.R.D.), consiste básicamente de las variaciones en la actividad óptica esto es, el ángulo de rotación " α ", respecto a la variación

de la longitud de onda de la luz incidente λ . Así, cuando el medio a través del cual pasa la luz muestra dicroísmo circular, entonces la luz polarizada a la derecha será absorbida de manera diferente que la luz polarizada a la izquierda. Los espectros de O.R.D., se presentan como gráficas de α como función de λ , (véase figura 4a). La medida del dicroísmo circular por otra parte, está relacionado con la luz absorbida exclusivamente. Ello tiene una gran relevancia en el estudio de los compuestos con actividad óptica. Los espectros de dicroísmo circular el cual, se conoce también con las siglas de las iniciales de su nombre en inglés (C.D.), se presentan como gráficas de: la diferencia del coeficiente de extinción de la luz absorbida a la derecha "id est": $(\epsilon_r - \epsilon_d)$ vs la longitud de onda correspondiente λ . (Véase ahora la figura 4b). A estos dos fenómenos se les conoce colectivamente como el efecto Cotton (véase figura 4b). El trabajo efectuado con este tipo de técnicas en proteínas metálicas generalmente indica si el ión metálico involucrado, está colocado en un sitio asimétrico o no. Un ejemplo del uso de esta técnica es el de la proteína conocida como Ferritocromo-c, que en el espectro visible muestra la clase de simetría correspondiente a la del grupo "hemo", al efectuar e interpretar este por medio del efecto Cotton ⁽¹⁴⁾.

c) Las técnicas de resonancia magnética: R.M.N. y R.P.E.: Estas dos técnicas, resonancia magnética nuclear y resonancia paramagnética electrónica, han mostrado ser de un inmenso valor en los estudios de las proteínas metálicas. Así, la resonancia magnética protónica se ha utilizado tanto para estudios de los detalles estructurales de las proteínas en solución, como para determinar qué clase de interacciones presenta una proteína ante la presencia de un ión metálico, a través de la

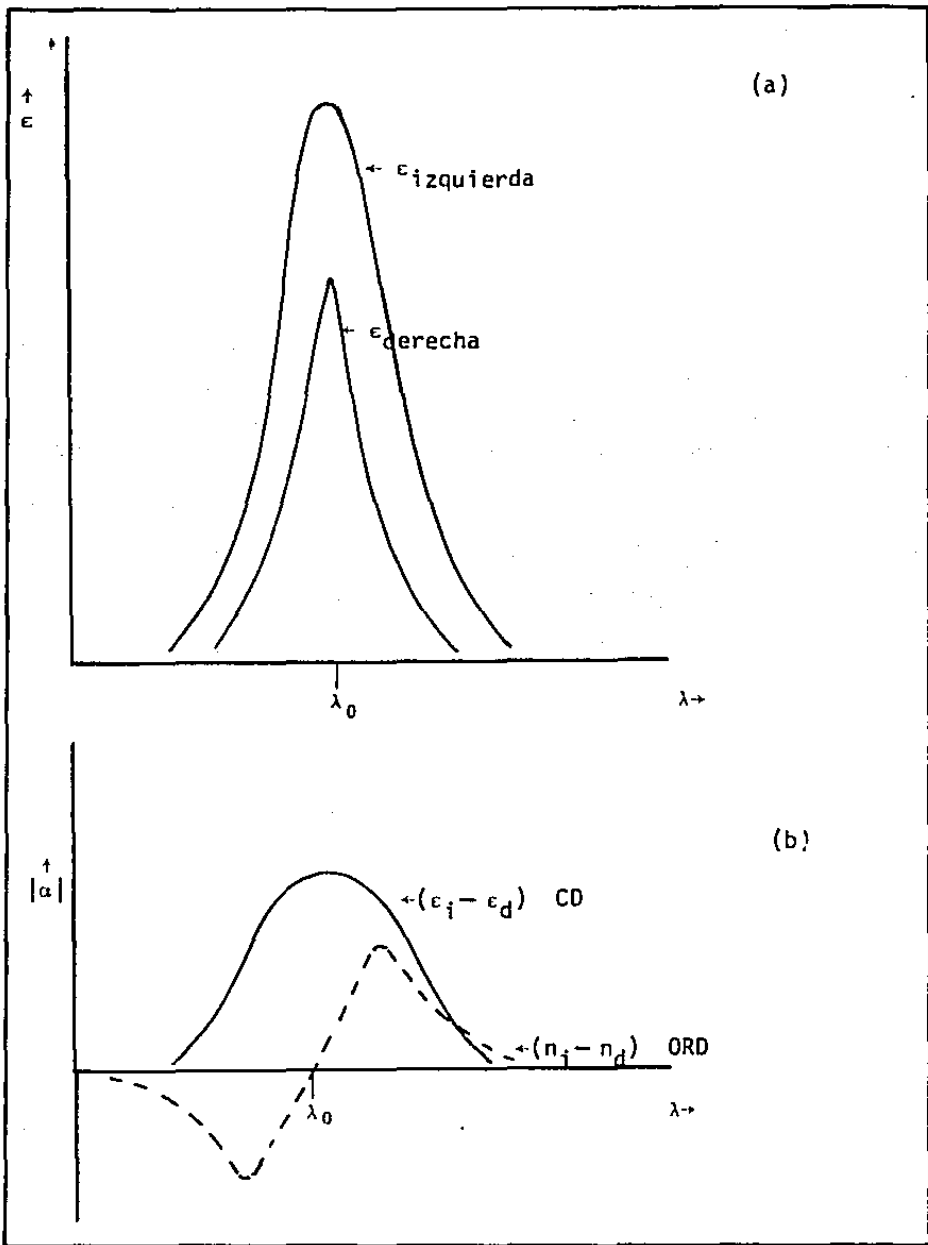


FIGURA 4

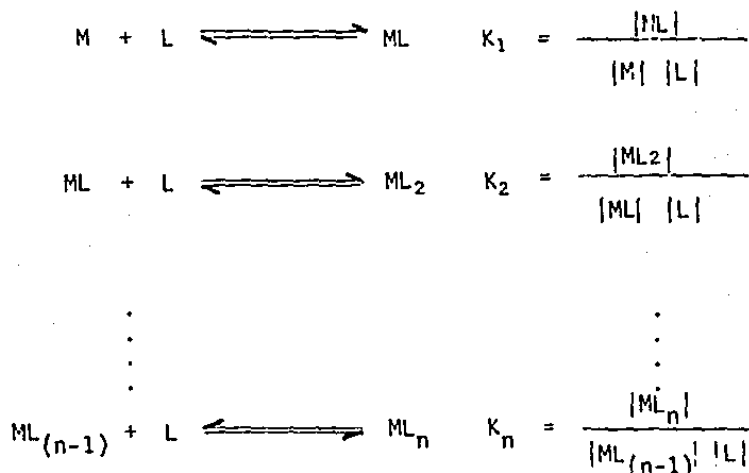
Diagramas del efecto Cotton.

observación de los cambios mostrados en el espectro de la proteína en cuestión ante la presencia y en la ausencia del ión metálico correspondiente. Por otra parte, la resonancia paramagnética electrónica que se conoce por las siglas R.P.E., puede dar información acerca del estado de oxidación de los iones metálicos, de la naturaleza de los ligantes unidos a un ión, de la covalencia del enlace, así como de la estereoquímica del entorno próximo al metal. Con lo anterior resulta evidente la utilidad de ambas técnicas en el estudio de las proteínas metálicas. Sin embargo, ambas presentan algunos problemas prácticos para la adquisición de datos.

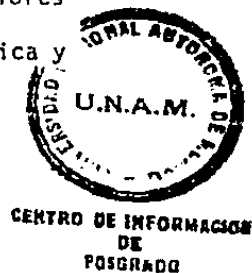
C) LAS DETERMINACIONES TERMODINAMICAS:

Es por medio de este tipo de determinaciones que se consigue tener una medida cuantitativa de las interacciones entre los iones metálicos y el sistema en el que actúan. Evidentemente todas las determinaciones, ya de constantes de formación, ya de potenciales de óxido reducción, son asequibles solo en el caso de tener reversibilidad en la reacción estudiada. Como es lógico, todas las determinaciones deben efectuarse cuando se ha llegado al equilibrio y, evidentemente, los métodos analíticos utilizados para obtener las cantidades necesarias en cada determinación no deben alterar este equilibrio. Es un criterio general establecido, el reportar ese tipo de determinaciones para los experimentos efectuados a temperatura ambiente (25°C) y con ciertas condiciones de fuerza iónica que, para el caso de los estudios en bioquímica y bioinorgánica resulta ser 0.1M.

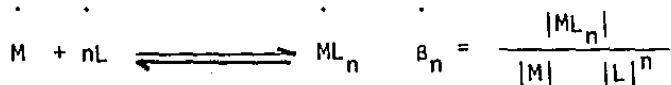
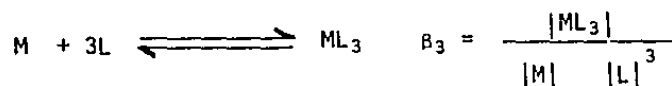
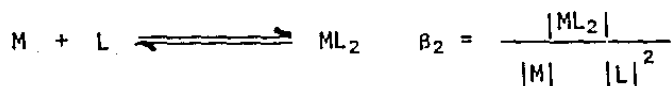
a) Las constantes de formación: En general, se puede considerar que para el caso de la formación de compuestos de coordinación se pueden encontrar varios casos, los cuales se reseñan a continuación, presentando las relaciones que permiten obtener los valores numéricos que se pueden correlacionar con la estabilidad de los compuestos formados^{13,15}:



En donde M es un ión metálico, L es el ligante con el que está reaccionando, n es el número máximo de ligantes con los que puede reaccionar M, K_i son los valores obtenidos para las constantes de equilibrio de la formación del compuesto ML_i y finalmente $|L|$, $|M|$, $|ML|$, $|ML_2|$, etc., son las concentraciones de las especies correspondientes medidas en el equilibrio. Ahora bien, aunque en forma estricta deben de usarse las actividades de las especies en vez de las concentraciones, los valores de las constantes se determinan para varios valores de fuerza iónica y

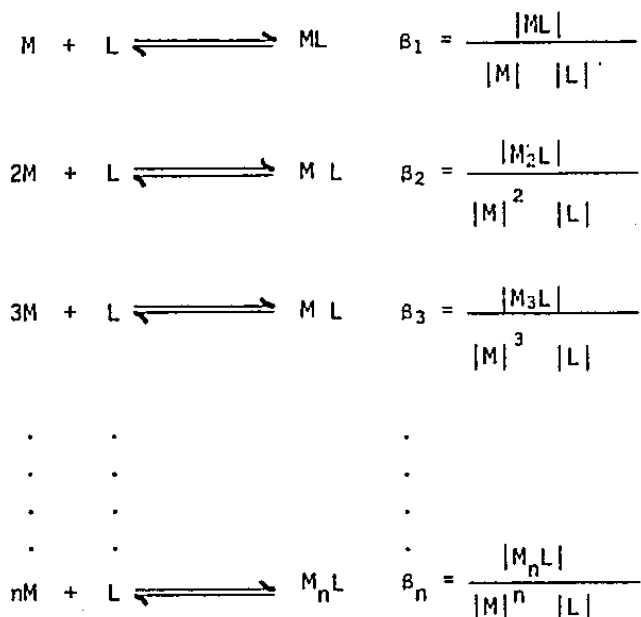


entonces se puede encontrar el valor de las constantes de formación, para un valor hipotético de fuerza iónica de cero, a través de una extrapolación. Cuando lo anterior es impracticable, siempre se puede recurrir a la comparación de varios sistemas con fuerza iónica idéntica, lo cual, tiene una gran utilidad. Una forma alternativa de expresar las constantes de formación es utilizando las llamadas constantes globales, β_i de la reacción. Estas se expresan como sigue:



Donde los símbolos ya han sido definidos. Ahora bien, es evidente que para el caso de que n sea igual a uno, esto es, que el compuesto tenga una relación estequiométrica metal: ligante de (1:1), no se presenta la necesidad de definir dos tipos de constantes pues $\beta_1 = \kappa_1$. A la vez,

cuando el número de metales al que puede unirse un ligante dado es mayor que uno, entonces deben considerarse las relaciones siguientes, que para el caso mas general se escriben como:



Desde ahora las β_1 representan las constantes de formación globales para el complejo polinuclear formado y todos los demás símbolos tienen el mismo significado que antes. Finalmente, en el caso de que los iones metálicos sean de diferente tipo y hubiesen dos o más clases de ligantes, se tiene la definición más general de las constantes globales:

$$\beta_{mnqr} = \frac{|M_m N_n L_q T_r|}{|M|^m |N|^n |L|^q |T|^r}$$

Donde las β_{mnqr} se refieren a la constante global correspondiente al complejo que tiene los iones metálicos M y N, los ligantes L y T, con sus estequiometrias, m, n, q y r; respectivamente.

Como ya se ha indicado, las constantes de estabilidad en un sistema pueden determinarse siempre y cuando el método analítico utilizado no perturbe el equilibrio del sistema. Un método ampliamente utilizado por sus características es el potenciométrico, el cual sólo requiere de la capacidad de protonación del ligante, y por tanto el conocimiento del pK_a del ácido conjugado del mismo. La exactitud de este método se ve seriamente cuestionada cuando el pK_a del ácido conjugado al ligante estudiado es menor de 2. Como puede verse este método consiste básicamente en hacer competir al ión hidronio y al ión metálico por el ligante. El desarrollo del experimento es simplemente, titular el ligante en presencia del metal en una solución con un ácido fuerte de concentración conocida, leyendo el pH a intervalos de concentración adecuada. De manera alternativa, se puede titular una mezcla de un ácido en presencia de ligante con una solución de sal metálica. Finalmente, otra manera de efectuar la determinación es titular una mezcla del ión metálico y el ligante con una base fuerte. Los resultados se obtienen a través de la diferencia de la concentración de iones de hidronio libre en solución y el ácido total agregado, esta, será una medida de la cantidad de ligante protonado, por medio del pK_a puede obtenerse la concentración del ligante libre, lo cual permite a su vez determinar la cantidad de ligante coordinado pues:

$$L_T = [LH^+] + [L] + [LM^{n+}]$$

Donde, L_T es la concentración analítica del ligante, $[LH^+]$ es la concentración de ligante protonado, $[L]$ es la concentración de ligante libre y $[LM^{n+}]$ es la concentración de ligante coordinado. Evidentemente, para el caso de que el compuesto formado tenga la relación metal: ligante de 1: 1 la determinación de la constante de estabilidad es muy fácil ya que se puede hacer directamente de los datos mencionados. Sin embargo si este no fuese el caso, el cálculo de las constantes se puede complicar mucho.

La utilidad de este tipo de determinaciones es de gran valía en una gran cantidad de campos de la química. En particular, en el caso de la bioinorgánica, facilita el estudio de la interacción metal-ligante a través de una serie de generalizaciones. Estas pueden ser sintetizadas en los siguientes puntos:

1° Las constantes de formación sucesivas decrecerán, si no existe algún efecto colateral asociado a la propia interacción. Este es un fenómeno estadístico que refleja el decremento del número de sitios de coordinación asequibles del ión metálico o bien el decremento del número de sitios en los cuales puede alojarse el ión metálico en un ligante con varios sitios.

2° Las repulsiones intramoleculares e intermoleculares durante la interacción y posteriores a la formación del complejo producirán una disminución en el valor de la constante.

3° La existencia de varios átomos donadores unidos en una misma

molécula, esto es si el ligante es multidentado, producirá un incremento en el valor de la constante del complejo formado respecto a aquellos complejos cuyos ligantes no son multidentados. Este efecto se conoce con el nombre de 'efecto quelato'. Además de lo anterior se conocen una serie de generalizaciones empíricas, acerca de los factores que afectan la estabilidad de los compuestos de coordinación, entre las que deben mencionarse las siguientes:

La serie de Irving-Williams^{9,16}: Esta, indica el orden con el cual se incrementa el valor de la constante de formación (o estabilidad) de los complejos de los diferentes metales de transición

Las clases a y b de los iones metálicos de Ahrlund, Chatt y Davies^{17}: Aquí se proponen dos clases de iones metálicos dependiendo de la reactividad que estos presentan frente a diversos tipos de ligantes.

El principio de ácidos y bases duros y blandos de Pearson^{18,19,20}: Que basándose en las dos generalizaciones anteriores y una multitud de datos acerca de la reactividad de las especies químicas, propone este principio en el cual, indica lo siguiente: "un ácido duro (o blando), reacciona preferentemente con una base dura (o blanda)", habiéndose obtenido los conceptos de duro y blando empíricamente.

Así, considerando lo anterior y en términos de los valores numéricos precisos de las constantes de estabilidad, se puede racionalizar una gran cantidad de información química que a su vez, permite predecir e inferir en lo concerniente a los sistemas sujetos a estudio.

Así, estas características de los iones metálicos, de gran importancia desde el punto de vista biológico, permiten establecer correlaciones entre la interacción a nivel molecular, con el fenómeno biológico en sí. A la vez, en el caso de profundizar en el estudio de la interacción a nivel molecular, se presenta en ocasiones la necesidad de efectuar cambios de los iones que resultan activos en una molécula. La información obtenida a través de las generalizaciones ya mencionadas es de importancia vital para el experimentador (véase el párrafo correspondiente a "intercambio metálico").

Ahora bien, en el caso de los compuestos metálicos con actividad biológica se ha observado que existen cierta clase de preferencias de los iones metálicos por algunos grupos ligantes en particular. Esto es, existen átomos donadores que confieren mayor estabilidad a los compuestos que forman con algunos iones metálicos, que la que estos compuestos presentan con otros átomos donadores. A este respecto se muestra en la tabla VI cuales son estas 'preferencias' para una serie de iones metálicos, mostrando tanto el tipo de átomo donador, como el grupo ligante del que procede.

TABLA VI ^(1,2,20)

ION METALICO	ATOMO DONADOR	PROCEDENCIA
K ⁺	Oxígeno	Donadores por oxígeno monocargado o neutro.
Mg ²⁺	Oxígeno o Nitrógeno	Carboxilato, fosfato o donadores por nitrógeno no aromático.
Ca ²⁺	Oxígeno o Nitrógeno	Afinidad ligeramente menor por fosfato, mayor por nitrógeno.
Mn ²⁺	Nitrógeno u Oxígeno	Mayor afinidad por nitrógeno aromático, menor por fosfato.
Fe ²⁺	Nitrógeno o Azufre	—SH, —NH de aminoácidos y en general menor afinidad por $\begin{array}{c} \text{—C=O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$
Fe ³⁺	Nitrógeno u Oxígeno	—NH ₂ , Porphirínicos y $\begin{array}{c} \text{—C=O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$
Co ³⁺	Similar al anterior.	
Cu ⁺	Azufre	—SH o —S—S— de cisteína.
Cu ²⁺	Nitrógeno u Oxígeno	—NH ₂ > R ₂ NH > R ₃ N >>> $\begin{array}{c} \text{C=O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$
Zn ²⁺	Nitrógeno	De imidazol o de cisteína.

b) Los potenciales de óxido-reducción: Como en el caso de las constantes de estabilidad, este tipo de determinaciones debe efectuarse manteniendo constantes tanto la temperatura (usualmente 25°C), como la fuerza iónica, dependiendo del tipo de sistema medido (el caso de los sistemas de interés biológico es de 0.1M). En general, se puede observar que los potenciales de reducción o de oxidación, varían de acuerdo al entorno que rodea al sistema óxido-reductor. Así, se tienen potenciales de lo más diverso para un mismo metal, dependiendo tanto de los ligantes que lo rodean, como del arreglo de éstos alrededor del metal. En el caso de las proteínas metálicas y de los sistemas biológicos donde la presencia de los iones metálicos es importante en la función, estos dos factores se conjuntan, pues a la vez los posibles ligantes son todos los diversos grupos con átomos donadores de electrones (ver tabla VI) y se tiene una gran cantidad de restricciones para la posición que estos ocupan alrededor del metal. Ello tiene como consecuencia la producción de entornos poco usuales para el ión en cuestión y consecuentemente, diferencias muy grandes en sus potenciales de oxidación. Lo anterior tiene una gran importancia pues permite explicar una gran cantidad de propiedades catalíticas de algunas biomoléculas ⁽²⁰⁾.

D) LOS COMPUESTOS MODELO:

La gran complejidad de los sistemas biológicos tiene como consecuencia que su estudio resulte extremadamente complicado. Así, en el caso de los compuestos metálicos de las proteínas, se presentan una gran cantidad de inconvenientes respecto a la detección de los cambios en

las propiedades del ión metálico en la proteína, pues usualmente la relación entre las concentraciones relativas entre el metal y la proteína es muy pequeña. Por ello, se tiene que la posible interpretación de los cambios mencionados, en el caso de lograr obtenerlos, se ve muy reducida debido a la gran cantidad de interacciones en el sistema. Lo anterior obliga a buscar compuestos mucho más simples, que permitan 'simular', al menos en parte, las posibles interacciones entre los iones metálicos y el sistema en cuestión. Así, las conclusiones que puedan obtenerse del estudio de estos compuestos podrán extrapolarse en algunas ocasiones al sistema original que se ha simulado. A manera de ejemplo se tiene: la simulación del enlace metal-proteína por medio de los compuestos formados entre un ión metálico y aminoácidos simples.

Como corolario, estos compuestos modelo ilustran el papel de los iones metálicos en el hormado biomoléculas y su posible acción dentro de la biosíntesis. {5}

E) LOS ESTUDIOS CINÉTICOS:

En este tipo de estudios generalmente, el interés principal es el uso de los sistemas modelo para poder inferir a través de su comportamiento frente a los iones metálicos, cuáles son las relaciones entre estos últimos y los sistemas biológicos, por un lado y el estudio de las interacciones metal-proteína por otro. Evidentemente el poder comparar los diferentes iones metálicos frente a un sistema dado tiene

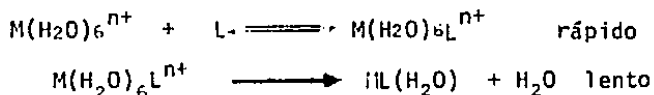
gran importancia. Para compararlos cuantitativamente es necesario obtener datos cinéticos y a la vez datos de las constantes de formación.

Con los datos observados se pueden obtener patrones de comportamiento y de ahí una guía para la deducción del mecanismo, de aquí a raíz de la proposición de este, se puede inferir cual es el tipo de interacción surgida entre el ión metálico y el sistema en el que actúa.

Así por ejemplo, en muchos sistemas modelo el efecto catalítico que presentan diversos iones metálicos sigue el orden de la serie de Irving-Williams, es decir, la velocidad de la reacción tiene la misma secuencia que la de las constantes de formación de complejos. Sin embargo, si se analizan las velocidades de reemplazo del agua en los complejos octaédricos, la velocidad de reemplazo del agua es:



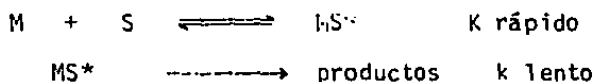
que claro, es diferente a la serie de Irving-Williams. Esto sugiere para esta reacción, un mecanismo en el cual una molécula del ligante forme un complejo de esfera externa por un proceso de difusión muy rápido y el paso determinante de la reacción involucra el reemplazo de la molécula de agua por el ligante a través del mecanismo apropiado, esto es:



de la comparación de las secuencias en los dos casos se sigue que en los compuestos modelo mencionados el paso determinante de la reacción, no es, el de la formación de un complejo, aún más dado que la velocidad cata-

lítica sigue el orden de la serie de Irving-Williams, podría pensarse que en el paso determinante de esta reacción existe un rearrreglo del complejo metal sustrato en el cual el ión metálico asiste a la proteína para orientar al sustrato para la reacción.

Así, la velocidad de la reacción, cambiará de un metal a otro, dependiendo del grado de formación del complejo, de tal manera que existirá una relación directa entre la constante de la velocidad catalítica y la constante de formación. La reacción anterior puede entonces esquematizarse como sigue:



En forma alternativa cuando se estudian algunas proteínas, se utilizan varios iones metálicos con el objeto de tener manera de comparar los parámetros obtenidos para cada uno de los metales usados y así poder encontrar cual es la tendencia que presentan. Así, se pueden observar no solamente los cambios surgidos en la misma proteína ante los cambios del ión metálico, sino a la vez se pueden analizar las interacciones metal-proteína en sí.

CAPITULO IV

EL METODO DE STOPPED FLOW

CAPITULO IV

1) INTRODUCCION

Tomando en consideración la gran variedad de métodos utilizados para la medición de parámetros cinéticos, accesibles en mayor o menor medida en la actualidad, resulta conveniente situar al método utilizado en este trabajo, respecto a las características principales de los demás métodos en general y a través de una somera revisión, compararlo con los métodos correspondientes a la clase a la cual pertenece.

Este método corresponde a la categoría de los métodos de flujo, (véase la tabla VI) los cuales se han discutido ampliamente en la literatura^(41,42,43,44). Este tipo de métodos tiene la capacidad de detectar tiempos de vida media tan cortos como 0.001 s.. Ahora bien, es evidente que esta capacidad de detección puede verse afectada por diversos factores, siendo el principal el de la mezcla de los reactivos, la cual además de que debe ser muy eficiente, debe efectuarse en el menor tiempo posible. Este problema se ha resuelto por medio del diseño de cámaras de mezclado especiales con tiempos muertos (vide infra) muy cortos.

Entre los métodos de flujo deben considerarse como importantes tres formas en las cuales se pueden tratar a los reactivos, las cuales, se describirán a continuación, presentandose de manera esquemática en

1a figura 5

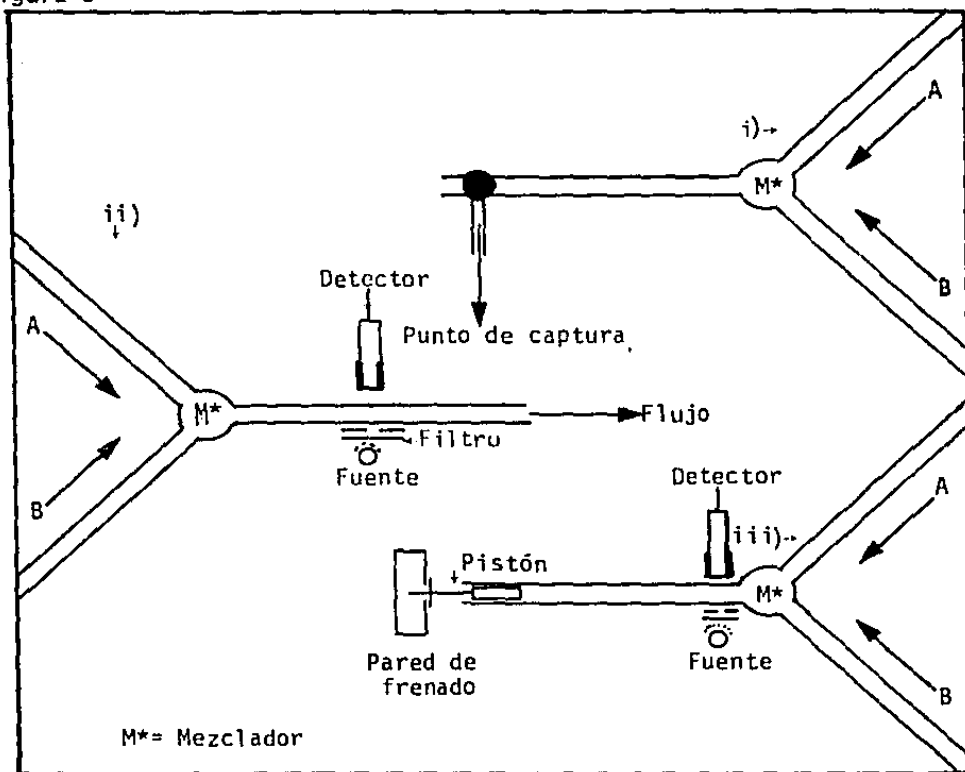


FIGURA 5: Los tres métodos de flujo más comunes.

i) El método de 'quenching flow'⁽⁴⁵⁾: después de mezclar los reactivos, la reacción se amortigua o detiene por alguno de los métodos siguientes: enfriamiento brusco, precipitación de un reactivo o bien destrucción por medio de un oxidante fuerte o un ácido concentrado. Ya detenida la reacción se inicia el análisis de los productos o reactivos escogidos. Lo anterior puede repetirse tantas veces como fuese necesario, controlando cada vez, las concentraciones relativas de ambos reactivos

o el tiempo de la reacción. Esto se puede gobernar por medio de los cambios en la velocidad relativa del flujo de los reactivos, o bien, por medio de los cambios en la distancia recorrida por la mezcla de la cámara mezcladora al sitio donde se le captura a ésta. De esta manera, se pueden obtener una serie de puntos que correlacionan las concentraciones de uno o varios de los reactivos contra el tiempo de reacción, es decir, del grado de avance de la reacción, lo que permite determinar la constante de velocidad del sistema en cuestión. Este método cuyo nombre significa aproximadamente 'flujo capturado', a pesar de ser tan simple, tiene varias desventajas, siendo la principal lo tedioso del método analítico.

ii) El método de "flujo continuo"⁽⁴⁶⁾: puede dejarse fluir la mezcla de los reactivos de manera continua, utilizando métodos de monitoreo convencionales para la detección de los cambios en la concentración, de uno o varios de los reactivos, ya sea en un solo punto del lugar por donde fluye la mezcla de reacción, cambiando la velocidad de flujo de la misma, o bien en varios sitios a lo largo del camino de la mezcla. En ambos casos se obtienen una serie de valores que correlacionan el avance de la reacción respecto al tiempo. Por medio de esta serie de valores, se puede obtener el valor correspondiente de la constante de velocidad para la reacción medida. En este caso, la gran ventaja que representa el poder determinar las constantes de velocidad para diversas concentraciones relativas de reactivos se ve disminuída en mucho, por las enormes cantidades de reactivos consumidos, que hace prohibitivo el uso de este método en muchas ocasiones.

iii) El método de "stopped flow"^{47}: finalmente se tiene que la mezcla no tiene que fluir constantemente, ni tampoco extraerse del sistema de reacción, sino que ahora, se le permite recorrer un determinado camino, frenándose abruptamente iniciándose a la vez la observación de alguna propiedad relacionada con la concentración, en algún punto lo más cercano posible a la cámara de mezclado. En este método debe de contarse con una respuesta muy rápida del aparato de monitoreo, pues aquí las observaciones se efectúan de manera continua para la totalidad de la reacción. Debido a la gran cantidad de ventajas que este método presenta con respecto a los dos anteriores, es este el más popular. Puede considerarse que las ventajas principales de este método, respecto a los otros revisados son fundamentalmente, el no tener que hacer un gasto muy grande de reactivo, no tener que perturbar el sistema para analizarle y el poder examinar la reacción de manera continua y no por puntos aislados. Aunado a lo anterior, este método puede acoplarse a una gran cantidad de métodos de monitoreo.

2) EL APARATO DE STOPPED FLOW

Este aparato construido por vez primera por Gibson y Milnes^{48} en 1963, para el estudio de reacciones enzimáticas muy rápidas, en las cuales no se podían desperdiciar reactivos, no ha sufrido modificaciones importantes, desde su origen a la fecha. Ello puede constatarse tanto en los modelos experimentales descritos en la literatura (Gibson 1968, Taylor (1970)^{47 48 49}), como en los modelos comerciales fabricados por

compañías de instrumentación científica de los Estados Unidos (American Instruments o bien Gibson Durrum Inc.), los cuales son esencialmente idénticos al modelo original, salvo por pequeñas modificaciones de la disposición de algunos de los componentes del aparato.

Considerando lo anterior es pues factible describir de manera general las partes principales del aparato. Este, puede considerarse como dividido en tres partes principales (llamadas subsistemas de aquí en adelante) a saber:

- I) El subsistema de flujo
- II) El subsistema de control de temperatura
- III) El subsistema de detección

A continuación se presenta un esquema que muestra cuál es la disposición de los tres subsistemas (figura 6).

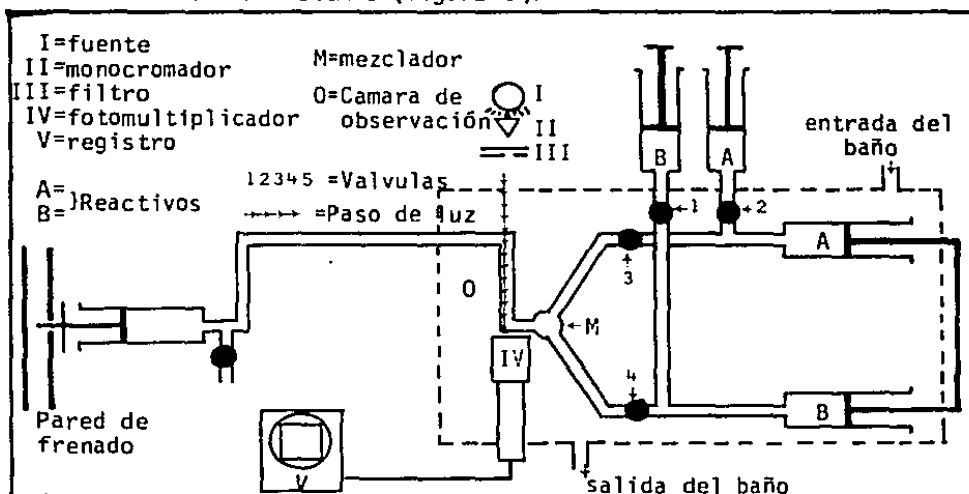


FIGURA 6: Esquema de la disposición de los subsistemas del aparato de stopped flow.

I) El subsistema de flujo.

El principio de operación de este subsistema, puede comprenderse a través de la descripción funcional del mismo. Previamente debe considerarse que el subsistema se encuentra dividido a su vez en cuatro bloques los cuales son los siguientes:

- a) El bloque de válvulas
- b) El bloque de almacenamiento
- c) El bloque de mezclado y la cámara de observación
- d) El bloque de drenaje.

A continuación se presenta un esquema que muestra a cada una de las partes del subsistema de flujo donde se indica cual es la disposición de cada uno de los bloques y las partes que lo componen (figura 7).

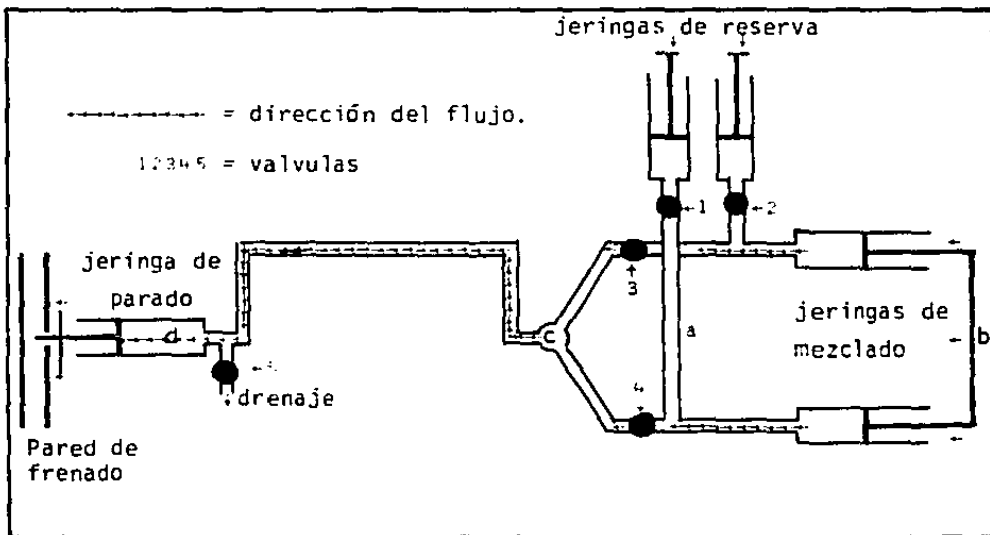


FIGURA 7: El subsistema de flujo.

Ahora bien, la descripción del subsistema se hará por medio del esquema indicando cuál es el camino de los reactivos durante la operación del aparato.

1° Los componentes de la reacción se almacenan en las dos jeringas que componen el bloque de almacenamiento y que no están dentro del subsistema de control de temperatura. Estas jeringas se encuentran en la parte superior del bloque de válvulas (veáanse las figuras 7a y 8).

2° Los componentes de la reacción se hacen pasar a través del bloque de válvulas, a las dos jeringas de mezclado que forman parte del bloque de mezclado, estas jeringas se localizan a la derecha del bloque de válvulas (veáanse las figuras 7b y 8).

3° Los componentes de la reacción pasan de las jeringas de mezclado al venturi de mezclado, el cual completa el bloque de mezclado junto con el bloque de válvulas. El venturi de mezclado, está dispuesto de tal manera que los componentes de la reacción pasan directamente de las jeringas de mezclado al venturi por dos puertas conectadas a éste y salen de él por una puerta que se conecta a su vez con la cámara de observación (veáanse figuras 7c y 8).

4° Los componentes una vez que se han mezclado, pasan a la cámara de observación cambiando su dirección 90°, haciendo con esto que la mezcla quede expuesta al trayecto de un haz de luz que pasa a través de una ventana y sale por otra que está colocada donde el flujo cambia de

dirección 90° nuevamente (veáse la figura 7c).

5° La salida de la cámara de observación está conectada al bloque de drenaje. Este se halla constituido por la jeringa de parado y por la válvula de drenaje. La válvula de drenaje está interpuesta entre la cámara de observación y la jeringa de parado con objeto de poder drenar el sistema completamente. (veáanse las figuras 7d y 9).

6° Cuando los componentes de la reacción ya mezclados, fluyen a través de todo el sistema, son detenidos bruscamente por la jeringa de parada, a la que se le puede graduar un volúmen cualquiera. Este volúmen, queda determinado por un sistema mecánico externo. (veáse figura 7e).

A continuación, se muestran los esquemas de los bloques de válvulas y de drenaje en las figuras 8 y 9 respectivamente.

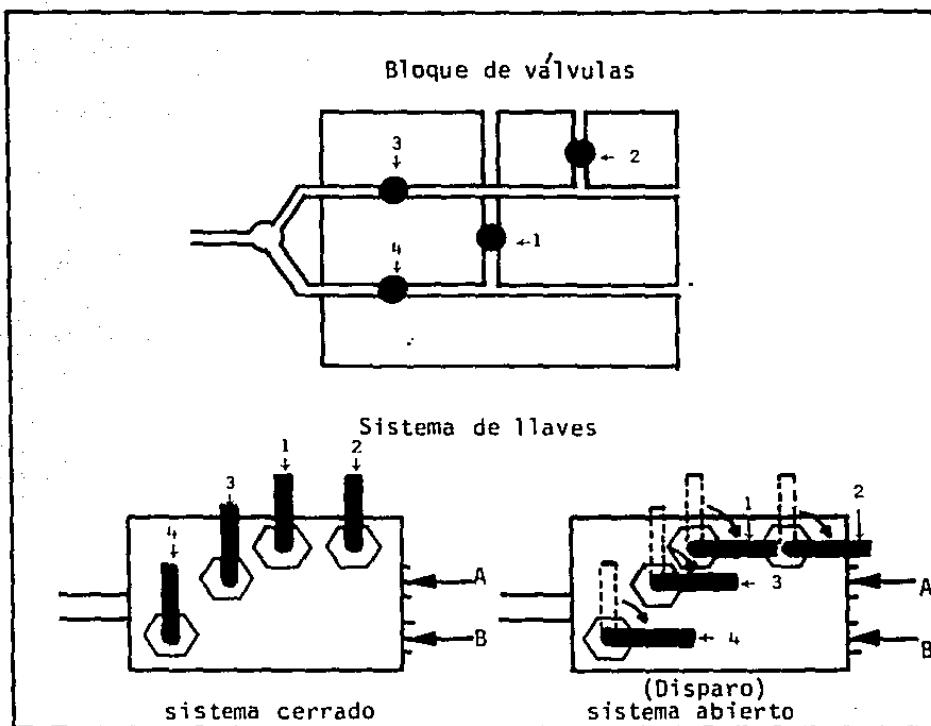


FIGURA 8: el bloque de válvulas y el sistema de llaves.

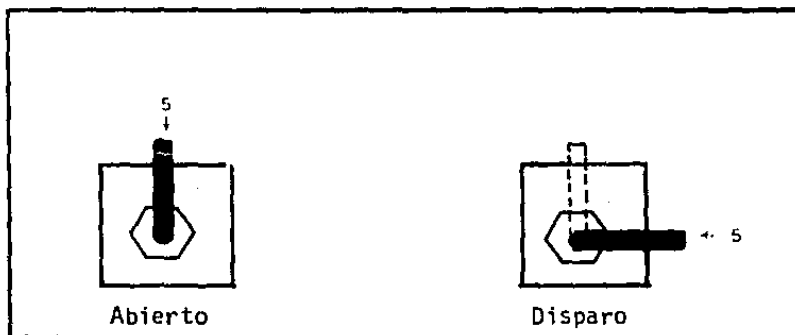


FIGURA 9: el bloque de drenaje

Independientemente del camino seguido por los componentes de la reacción dentro del subsistema de flujo, deben describirse algunos de los componentes del mismo para tener una idea de su funcionamiento y la disposición que ocupan.

El bloque de válvulas: consiste esencialmente de un sitio para cada jeringa con su respectiva entrada y una salida para cada componente, controlándose el exceso de éstos por medio de cuatro válvulas que interconectan los canales de entrada y salida. En la figura 8 puede verse el sistema de válvulas en las dos posiciones que usualmente se utilizan.

Las jeringas de almacenamiento: generalmente se utilizan jeringas comerciales, pero también puede utilizarse equipo especial para manejo de compuestos que son sensibles al aire o a la humedad.

Las jeringas de mezclado: son dos cilindros de vidrio de 2ml de capacidad con un pistón de cerámica o de acero, que se conectan al bloque de válvulas por medio de un empaque de teflón. Cuando el bloque de válvulas se coloca en posición de disparo y es accionado el sistema neumático, un pistón empuja violentamente los dos pistones de cerámica, desplazando un volumen idéntico de cada uno de las dos jeringas de manejo tal que ambos componentes son enviados al venturi de mezclado a una gran velocidad.

La cámara de mezclado: consiste de un sistema de compuertas de dos entradas y una salida, que se interconectan de tal modo que efectúan el

mezclado muy eficientemente. El esquema de uno de estos sistemas se muestran en la figura 10.

La cámara de observaciones: es un sistema que consiste de una serie de tubos conectados con dos vidrios de cuarzo, los cuales permiten la entrada y la salida del haz de luz que sirve para detectar los cambios que ocurren en el seno de la reacción.

La jeringa de mezclado: consiste básicamente de una jeringa revestida con acero para que pueda soportar los cambios bruscos en la presión a consecuencia del empuje de la mezcla de reacción. Al cambiar el volumen esta jeringa dispara tanto el mecanismo de registro, como el de lectura conectados al aparato.

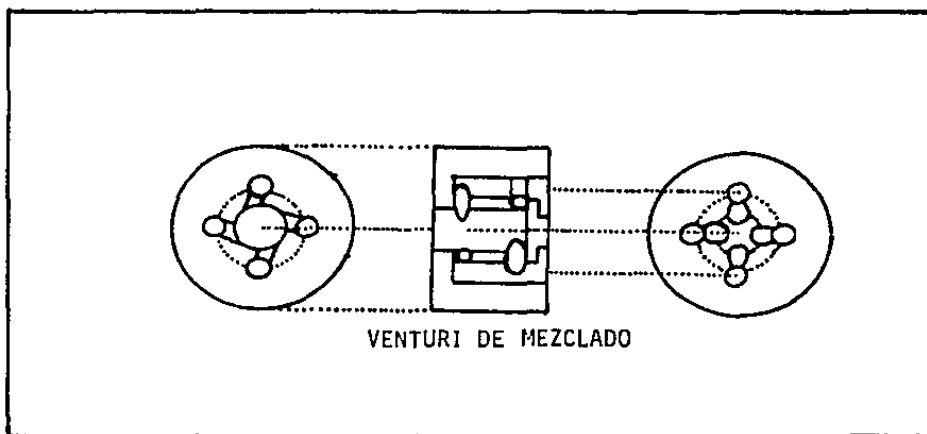


FIGURA 10: Vistas frontal, lateral y posterior del del venturi de mezclado

II) El subsistema de control de temperatura: consiste de un tubo de cobre en espiral sumergido en un baño de temperatura constante que se comunica con el subsistema de flujo por medio de una entrada y una salida de tal modo que los reactivos y la mezcla se pueden mantener a temperatura constante. Este tipo de control de temperatura mantiene la mezcla de reacción entre los intervalos de temperatura utilizados generalmente para las determinaciones cinéticas. El esquema de este subsistema se muestra en la figura 11.

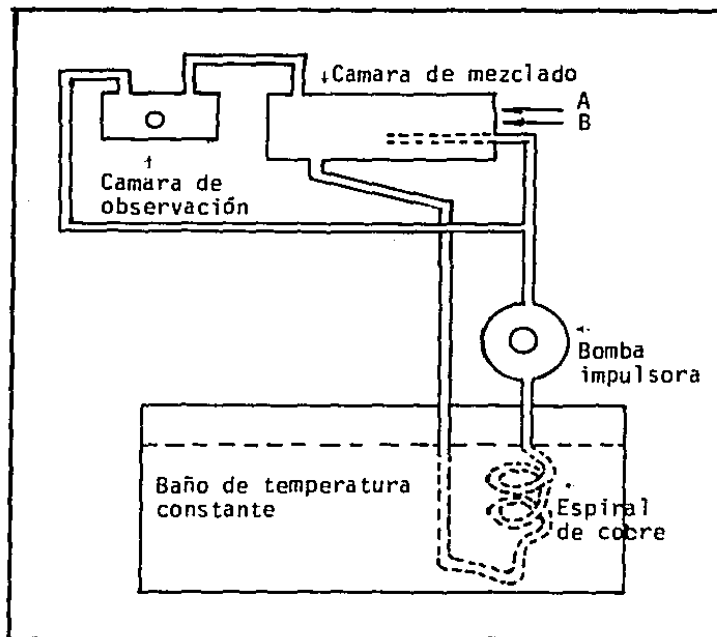


Figura 11: Diagrama del sistema de temp. constante

III) El subsistema de detección: este sistema consiste básicamente en algún sistema de monitoreo conectado a la cámara de observación, de tal manera que permita detectar la propiedad medida.

En el caso de los sistemas de monitoreo espectroscópico (UV, Vis, IR o fluorescencia), que son los métodos más usados con el aparato de stopped flow, se tiene generalmente el siguiente arreglo (veáse figura 12a): el haz de luz emitido por la fuente apropiada es monocromatizado, permitiendo con ello escoger la longitud de onda que se desee. El haz así tratado atraviesa la celda de reacción que consiste simplemente de dos ventanas de cuarzo, que están conectadas a una distancia de aproximadamente 2cm, a los lados del tubo por donde fluye la mezcla de reacción. Al atravesar la celda, el haz incide sobre un fotomultiplicador. Éste, conectado a un amplificador, al generar cambios de corriente ocasionados por los cambios en la concentración de los reactivos, permite registrar estos como la variación en la coordenada "y" de un osciloscopio, respecto al tiempo (coordenada "x" del osciloscopio). En general, los modelos comerciales de stopped flow están equipados con un amplificador logarítmico que permite transformar la transmitancia en absorbancia, automáticamente. Puede ser conveniente en algunos casos usar un segundo amplificador logarítmico que grafique directamente las líneas rectas correspondientes a reacciones de 1^{er} orden y pseudo primer orden. A pesar de que la pérdida de reactivos o avance de la reacción sin detectar, no representa ningún problema para las reacciones de primer o pseudo primer orden, el aparato tiene un tiempo muerto asociado, que debe considerarse en las mediciones de reacciones de segundo orden cuando sean extremadamente rápidas. En el caso de que la detección sea por medio de

la fluorescencia se debe modificar ligeramente la disposición del detector. (veáse figura 12b).

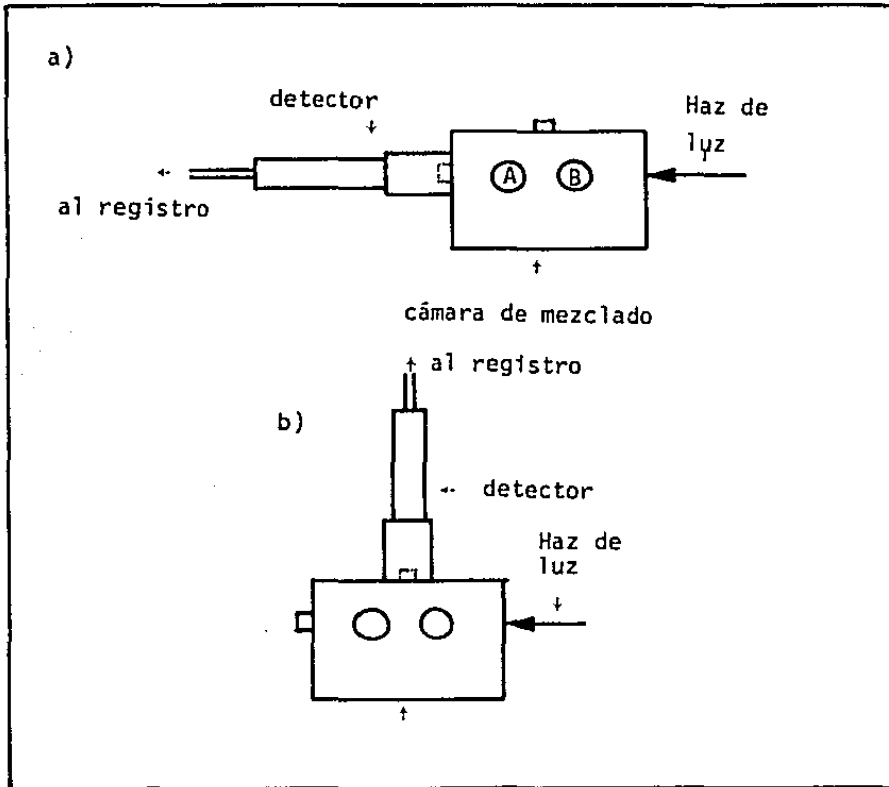


FIGURA 12: Opciones del aparato de stopped flow, para la detección de a) absorción y b) fluorescencia.

3) METODOS DE MONITOREO ACOPLABLES

La velocidad de una reacción se mide generalmente detectando los cambios en las concentraciones de los reactivos o productos (desapari

ción o aparición respectivamente), por medio de la medición de los cambios de la concentración respecto al tiempo durante el curso de la reacción, lo anterior se representa con las siguientes expresiones:

$$v_r = \frac{-d(\text{reactivos})}{dt} = \frac{d(\text{productos})}{dt} = \text{velocidad}$$

donde las unidades de la velocidad son usualmente Moles x Litro x segundo⁻¹.

Ahora bien, aún cuando en principio cualquier propiedad relacionada con la concentración puede utilizarse para medir los cambios en la reacción y así detectar este cambio, no todas ellas están relacionadas de manera lineal, por tanto es necesario conocer previamente cuál es esta relación. Por otra parte, la medición de la velocidad de una reacción es mucho más simple si se efectúa "in situ" y sin perturbar el sistema. También es evidente que si se sospecha el que la reacción es muy compleja, se debe de hacer uso de más de un método de monitoreo.

En la tabla que se muestra a continuación se pueden ver los métodos más utilizados para el monitoreo de las reacciones en solución.

TABLA VII
METODOS DE MONITOREO

METODOS	USOS
a) Espectroscópicos	
U.V. - Vis.	Es el más extendido de los métodos de monitoreo dentro del campo de la cinética. Se utiliza en casi todos los métodos.
Fluorescencia	Generalmente utilizado para el caso de reacciones de proteínas con fluorescencia propia o bien en las reacciones en que uno de los reactivos pueda etiquetarse fácilmente.
I.R.	Su uso ha quedado restringido a la detección en reacciones de intercambio protónico.
Polarimetría	Resulta imprescindible en el campo de la estereoquímica óptica. Por los mismos es poco usado.
R.M.N. (H)	Cada vez más desarrollada para la detección de cambios en el entorno protónico.
R.P.E.	Usada principalmente en las reacciones con radicales libres.
b) Otros:	
Electrodos de H^+	Muy utilizados en reacciones que involucran un cambio en la concentración de H^+ y en las cuales se puede establecer la condición de estado estacionario.
Electrodos de X (X = catión o anión)	Poco desarrollados.
Polarografía	Muy poco desarrollada.
Termografía	Muy poco desarrollada.

CAPITULO V

LAS LECTINAS

CAPITULO V

1) RESEÑA HISTORICA

Las lectinas fueron detectadas por primera vez hace aproximadamente cien años. Estas proteínas por su capacidad de aglutinar eritrocitos, reciben el nombre de hematoaglutininas y en particular las que proceden de vegetales se conocen con el de litohe-matoaglutinantes. Aparentemente, las lectinas se encuentran distribuidas muy ampliamente en el reino vegetal y particularmente en las legumbres.

La primera descripción de lo que ahora se conoce como una lectina fue dada en 1868 por H. Stilmart^{22}, el cual durante el estudio de la toxicidad de un extracto de la semilla de "ricinus comunis" en sangre, observó la aglutinación de los eritrocitos.

Más tarde se encontraron más de estos aglutinantes en otras plantas. Ello atrajo la atención de P. Erlich^{22}, el cual, estudiaba en el campo de la inmunología. Con su trabajo con las lectinas Erlich desarrolla algunos de los principios fundamentales de la inmunología. Una característica de la mayoría de los estudios efectuados con estas proteínas es el que se hacían con extractos crudos de los vegetales de los cuales procedían.

No es sino hasta el año de 1919, que J.B. Summer^{23a y 23b} logra aislar la primera de estas proteínas, siendo esta la concanavalina-A. Y fue este mismo investigador el descubridor de dos de las más importantes propiedades de las lectinas en general y de la concanavalina-A en particular. Estas propiedades son: La aglutinación de glicógeno por una parte y la inhibición de la hematoaglutinación al agregar azúcar de caña a una solución de la proteína.

Es con el trabajo de Summer con el que se fundamentan las bases para la comprensión del mecanismo de acción de las lectinas para la aglutinación de las células sanguíneas, ya que gracias a él se puede inferir que existen ciertos azúcares que aparentemente pueden ocupar los sitios de combinación de las lectinas interfiriendo con el acoplamiento de ésta con las células sanguíneas.

Hacia 1945 C. Boyd^{24} descubre otra propiedad de estas proteínas, esta se refiere a la selectividad de algunas de estas proteínas para aglutinar solo cierto tipo sanguíneo. Esta propiedad fué observada por Boyd en una lectina procedente de un cítrico. La proteína en cuestión aglutinaba solamente a los eritrocitos procedentes de sangre tipo A, sin poder aglutinar a los de tipo B. Como consecuencia de ello Boyd sugiere el nombre de Lectinas para estas proteínas, pues este nombre procede de la palabra latina "Legere" que significa seleccionar.

Aún cuando este tipo de selectividad no lo presentan todas las lectinas, todas ellas muestran selectividad frente a los monosacáridos.

La conexión entre la selectividad ante grupos sanguíneos y sacáridos fue establecida en 1953 por Watkins y Morgan^{25}.

2) PROPIEDADES, IMPORTANCIA Y USOS

Aparentemente la actividad biológica de las lectinas está supeditada a una sola propiedad química, ésta es, la capacidad de estas para enlazarse con los azúcares.

Cada molécula de lectina tiene dos o más regiones en las que se puede 'ajustar' una molécula del azúcar complementario. En el caso de un oligosacárido, el ataque ocurrirá en varias unidades de proteína. En general, a las regiones donde ocurre el ataque del sacárido se les conoce con el nombre de sitios reactivos. Ahora bien, en el caso de la hemaglutinación se tendrá, que la proteína se une a la pared celular por medio de estos sitios reactivos.

El enlace entre las lectinas y los azúcares es reversible, como en el caso de las reacciones enzima-sustrato y antígeno-anticuerpo^{42}. Esta última analogía es casi exacta en cuanto al probable mecanismo de reacción, donde la proteína tiene el papel del anticuerpo y el azúcar el de antígeno. Sin embargo, en el caso de las lectinas, no se ha logrado encontrar alguna que sea específica para compuestos que no sean carbohidratos, cosa que no ocurre en el caso de los anticuerpos. Por otra parte, se encuentra que ante las similitudes estructurales entre los anti-

cuerpos, las lectinas muestran una gran variedad de diferencias estructurales entre ellas. De hecho, puede considerarse que las lectinas solo comparten en común el ser proteínas.

La propiedad que más ha contribuido a darles a estas proteínas importancia en el campo de la bioquímica, es su capacidad de aglutinar preferentemente células malignas. Esta propiedad fue descubierta, como ocurre a menudo, por casualidad por J.C. Aub en el año de 1963^{26}. El cual al examinar la respuesta de células incubadas (normales y malignas) frente a varias enzimas, observó que solamente una de las enzimas presentó resultados prometedores, pero al estudiarla de manera más profunda, encontró que estaba contaminada por una lectina. Posteriormente al estudiar diversas lectinas se encontró que la concanavalina-A también aglutinaba preferentemente a las células malignas. Con estos experimentos, el mercado de las lectinas se extendió de tal forma que, en la actualidad, es relativamente simple conseguir muchas de estas proteínas con calidades de pureza excelente.

Respecto a la aglutinación de las células malignas, debe decirse que por regla general, éstas son aglutinadas por concentraciones muy pequeñas de las lectinas activas (10 a 15 $\mu\text{g/ml}$).

Finalmente, se debe indicar que aún cuando se han hecho grandes progresos en el estudio de los mecanismos de interacción entre las células malignas y las lectinas, todavía no se ha llegado, ni con mucho, a la comprensión completa del fenómeno. A continuación se muestra en la

tabla siguiente un resumen de las propiedades de las lectinas: (véase tabla VIII.)

PROPIEDAD	TABLA VIII ⁽²²⁾	APLICACION
Especificidad ante grupos sanguíneos	Tipificación sanguínea	Estudios estructurales
		Identificación de nuevos tipos
		Diagnósticos en secreciones
Toxicidad en animales		Estudios de valor nutricional
Inducción de mitosis en linfocitos		Constitución cromosomática
		Detección de anomalías genéticas
Precipitación de polisacáridos y glicoproteínas.		Aislamiento, caracterización y purificación de polímeros con carbohidratos.
		Modelos interacción antígeno-anticuerpo.
Enlace con sacáridos		Estudio de los sitios específicos de combinación de proteínas.
Aglutinación de células cancerígenas.		Investigación de la arquitectura de la pared celular y los cambios que en ella ocurren.

De la tabla anterior, se puede concluir que este tipo de proteínas tienen una gran utilidad para la bioquímica. Sin embargo, una de las pre-

guntas que durante mucho tiempo ha quedado sin respuesta, es el valor que este tipo de proteínas puede tener en el organismo del cual proceden, esto es, las plantas.

3) CONCAVALINA -A

Las lectinas, como la mayoría de los productos naturales, pueden purificarse por medio de métodos convencionales, tales como la cromatografía de intercambio iónico u otros absorbentes. Sin embargo, hace relativamente poco tiempo se ha estado desarrollando una nueva técnica de cromatografía, que aprovecha la capacidad de combinación de algunas proteínas con sus sustratos respectivos. Este método se le conoce con el nombre de cromatografía de afinidad.

De esta manera se ha logrado obtener una serie de lectinas con una gran pureza. Entre ellas se encuentra la concavalina-A, la cual se purifica con geles de dextrano (Sephadex) eluyendo con glucosa o bien con una solución de pH bajo.

La abundancia relativa de la concavalina-A en la planta de la cual es originaria (Concauallia ensiforme), es de 2.5 a 3% del peso total de la semilla, lo cual, aunado a la facilidad de extracción, la facilidad de su preparación y la gran variedad de mono y oligosacáridos con los que reacciona, hace de esta lectina un sujeto ideal para ser estudiado.

A) PROPIEDADES FISICAS DE LA CONCAVALINA-A.

Aún cuando esta proteína es biológicamente homogénea (95 a 98% de su peso precipita con dextrano) no lo es molecularmente en el intervalo de pH en el cual se une a los sacáridos. Este tipo de heterogeneidad se refiere al número de especies moleculares diferentes que son activas en cada uno de los pHs en que reacciona. Así, se ha demostrado que esta proteína puede separarse en varias especies moleculares cuando se utilizandisolventes disociantes fuertes. Las especies encontradas se han identificado como subunidades protoméricas, que al parecer permanecen intactas después de la separación. El peso molecular reportado para estas subunidades es de 2.7×10^4 uma. Ahora bien, las pruebas de P.M. vs pH muestran que esta proteína tiene varias especies moleculares, dependiendo del pH que tenga la solución en que se encuentre. Así se tiene que, cuando la solución tiene un pH menor de 6, la proteína forma especies de peso molecular de 5.5×10^4 uma, lo cual corresponde al de dos subunidades protoméricas. Cuando el pH de la solución es mayor que 6, pero menor que 6.7, el peso molecular por molécula varía lentamente hasta que, al llegar a pH de 6.7 o mayor, éste llega a 10^4 uma, lo cual corresponde a cuatro subunidades protoméricas^{27,28}.

B) LA ESTRUCTURA DE LA CONCAVALINA-A.

Según los resultados obtenidos por medio de cristalografía con ra-

yos -X de baja resolución, se puede proponer que los protómeros de la concanavalina-A, tienen forma similar a la de un domo, cuyas medidas serían de: 39 Å de ancho, 40 Å de largo y 42 Å de altura. Estos domos se aparean por la base con un eje de simetría C_2 . Los dímeros, a su vez, se aparean para formar un tetramero cuya simetría es similar a la de un tetraedro^{29}. Ver figura 13.

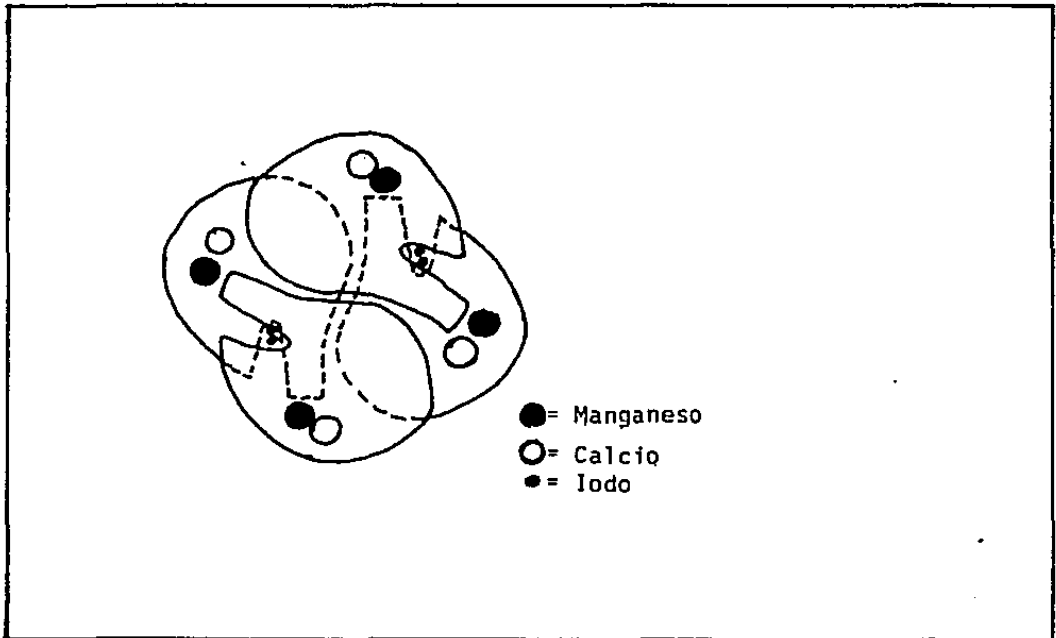


FIGURA 13: Esquema del tetramero de la concanavalina-A, donde se muestran las posiciones de los cofactores que la componen.

El contenido metálico de cada uno de los protómeros es equivalen-

te a un Mn^{2+} y un Ca^{2+} por unidad protomérica, y el número de sacáridos unidos a la proteína en el complejo proteína-sustrato es también de una molécula de sacárido por unidad protomérica.

En los estudios con microscopía electrónica de baja resolución, se ha observado que la superficie molecular aparenta ser relativamente suave, excepto por una pequeña depresión en cada protómero. Se ha observado también que es en esta depresión, donde se unen las moléculas de las especies inhibitorias de la actividad de la proteína^{29}.

La estructura detallada de esta proteína ha sido determinada por medio de los datos obtenidos con difracción de rayos-X de alta resolución^{30 y 31} y el estudio detallado de la secuencia de aminoácidos que la componen^{32}. Cada protómero intacto consta de 237 aminoácidos pero, debido a que el tratamiento para la extracción y aislamiento de la molécula es relativamente severo, algunas de las moléculas de concanavalina-A sufren rompimientos internos. Véase la figura 14.

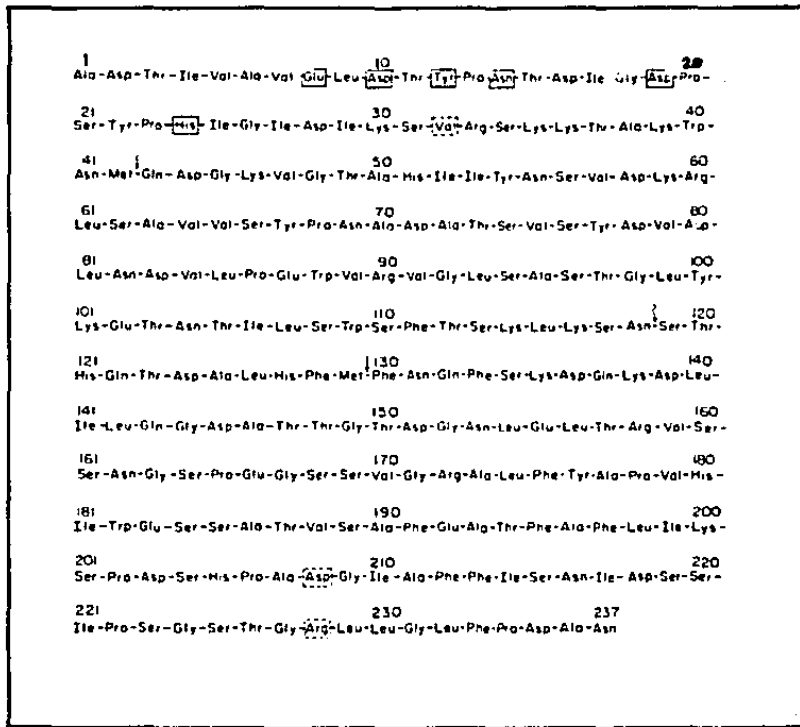


FIGURA 14; Secuencia aminoacídica de la Concanavalina-A

Aparentemente, las fragmentaciones internas en las moléculas de la proteína no hacen diferencia en cuanto a la estructura tridimensional de la proteína. Aún más, se ha observado que la actividad biológica de la proteína resulta ser constante, a pesar de que un gran número de las moléculas resultasen dañadas internamente durante el tratamiento⁽³⁴⁾.

También haciendo uso de las técnicas de R-X, se ha podido determinar claramente cuales son los sitios de coordinación de los iones metá-

licos. Estos, se encuentran en la parte superior del protómero. La disposición de los aminoácidos alrededor de cada metal es octaédrica y puede describirse como sigue: Cada metal está rodeado por seis ligantes y en ambos casos, cuatro de los ligantes pertenecen a la proteína y dos son moléculas de agua. De los ligantes procedentes de la proteína, dos de ellos son comunes a los dos iones (ambos de ácido aspártico). Entonces el arreglo completo puede describirse como un complejo binuclear con estructura de dos octaédros compartiendo una arista. Es importante indicar que esta región de la proteína tiene carácter ácido, lo cual, la diferencia de otras regiones de la misma. Ahora bien, una de las moléculas de agua está enlazada a la cadena proteica, por medio de un puente de hidrógeno con una molécula de serina. La otra molécula de agua está expuesta a la superficie, en el caso del entorno del Mn. En el caso del entorno del Ca el sitio tiene menor simetría y como en el caso del otro metal, se encuentra en una región con carácter ácido en la molécula de proteína. Otra diferencia entre los dos sitios es que las moléculas de agua que están coordinadas al Ca^{2+} se unen, a la cadena peptídica por dos grupos carboxilo a través de puentes de hidrógeno. Un esquema de la disposición de ambos metales en la molécula de con canavalina-A, se muestra en la figura 15.

Otra de las características de esta proteína es la presencia de estructura del tipo β , es decir, de estructura de capas por lo cual, la proteína puede formar dímeros y tetrámeros. Lo anterior confiere a la proteína una propiedad que se ha dado en llamar "valencia múltiple", y que se refleja en la capacidad de la proteína para aglutinar tanto gli-

cógeno como eritrocitos o células malignas^[32].

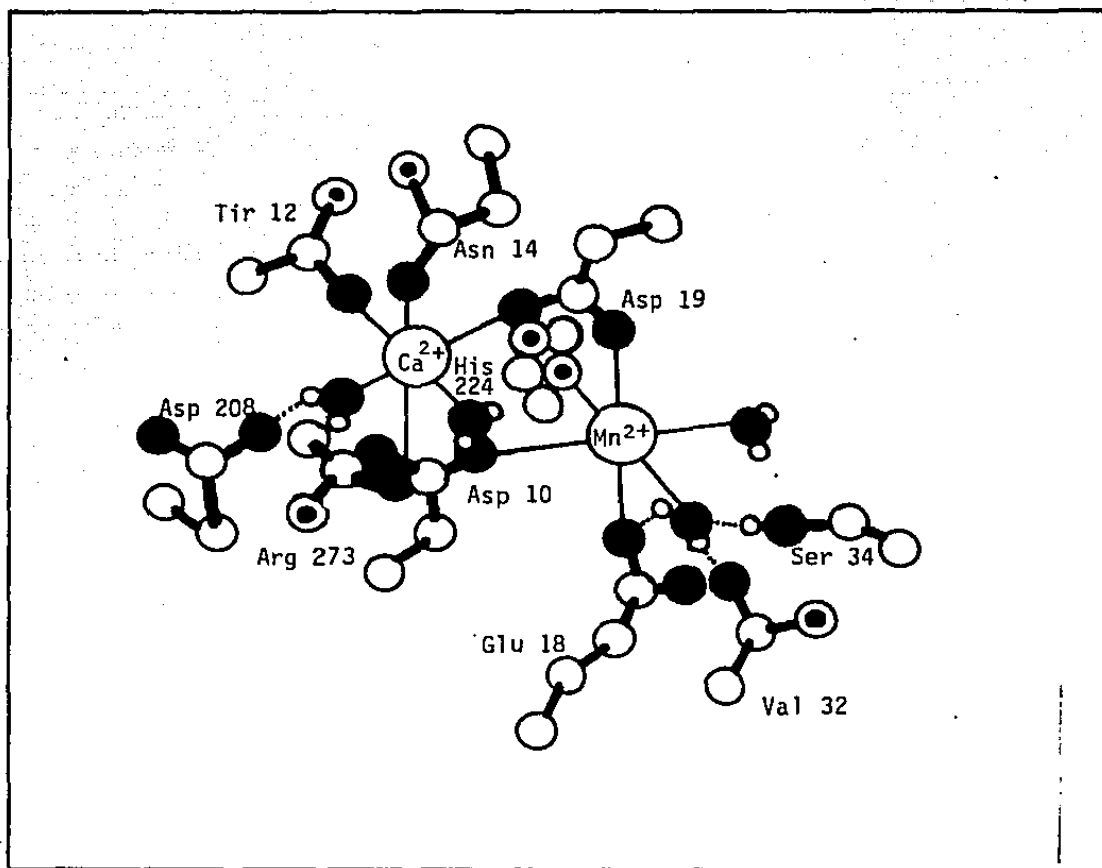


FIGURA 15. Disposición de los iones metálicos en el protómero de la proteína.

C) LA ACCION BIOLÓGICA DE LA CONCAVALINA-A.

La gran reactividad de esta lectina y el conocimiento, tanto de su especificidad como de su estructura, ha permitido que su uso en siste-

mas biológicos se haya extendido a una infinidad de campos. A manera de ejemplo lo anterior se puede ilustrar con los siguientes hechos:

Con la concanavalina-A se han hecho estudios que permiten, ya modificar, ya reasignar; las configuraciones de algunos polisacáridos. También, se ha usado en el aislamiento de un factor antihemofílico y su purificación subsecuente.

La síntesis, relativamente reciente, de algunos derivados insolubles de esta proteína ha permitido usarla en el aislamiento de algunas inmunoglobulinas{22}.

Por otra parte la concanavalina-A ha mostrado una serie de características que la hacen un excelente objeto de estudio. Estas pueden resumirse en los siguientes puntos:

- i) Toxicidad: Comprobada desde hace varios años en animales.
- ii) Aglutinación de algunas células: Embrionarias, espermatozooides, sanguíneas y algunos virus.
- iii) Estimulación de migración celular: En particular de algunas clases de células tumorales.
- iv) Actividad mitogénica:

Finalmente, como una de las características mas importantes y que le hace resaltar muy por encima de la mayoría de las lectinas comunes, esta su capacidad de aglutinar células malignas de manera preferente respecto a las células sanas. En lo particular se tiene a este respecto, el hecho de que esta proteína a diferencia de otras, aglutina células leu

cémicas en concentraciones tan pequeñas como 250 μ g/ml). También se ha observado que esta protefna tiene la capacidad de aglutinar cultivos de células transformadas por medio de su exposición a los rayos-X o con agentes químicos con propiedades carcinogénicas. A la par, se ha observado que esta lectina, no aglutina células sanas en las mismas concentraciones con las que actúa en células enfermas⁽³²⁾.

Por último, se tiene que conforme avanza el conocimiento de las propiedades químicas de esta protefna, se han modificado los mecanismos propuestos para la acción biológica de ésta.

D) PROPIEDADES QUIMICAS DE LA CONCAVALINA-A.

Como característica esencial de esta protefna se tiene su especificidad para aglutinar solo cierto tipo de sacáridos.

La concanavalina-A precipita con una serie de polisacáridos que tienen monomeros del tipo α -D-manopiranosil, β -D-fructofuranosil o D-arabinofuranosil. Esto incluye glucanos tales como el glicógeno, las amilopectinas y el dextrano. De la misma manera, se tiene que la lectina reacciona con polisacáridos procedentes de síntesis artificial tales como los D-manósidos o los fructósidos.

Además se ha observado que esta protefna pierde su capacidad aglutinante cuando se hace reaccionar con algunos monosacáridos. Dos de los

principales inhibidores de esta propiedad son la metil- α -D-glucopiranososa y la metil- β -D-glucopiranososa. Aunado a lo anterior, ninguno de los monosacáridos β equivalentes puede inhibir la capacidad de aglutinar polisacáridos de la proteína^[34]. Ver figuras 16 y 17.

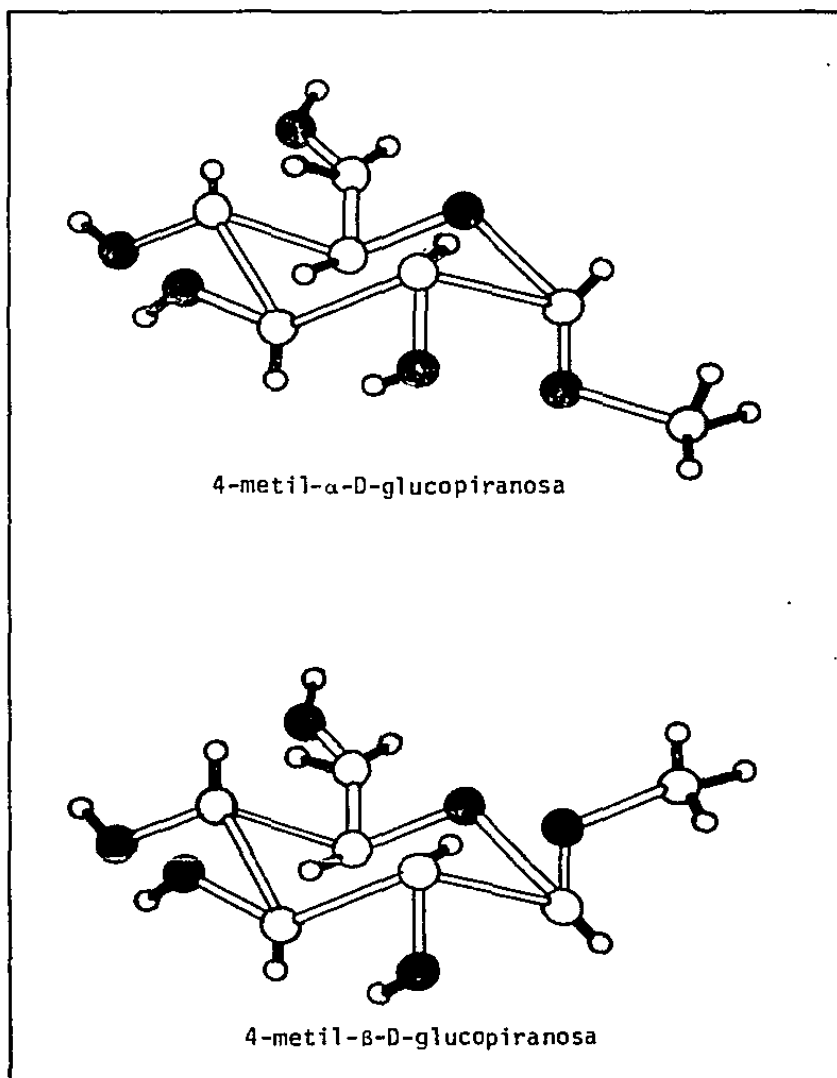


FIGURA 16: Las dos conformaciones de la D-glucopiranososa

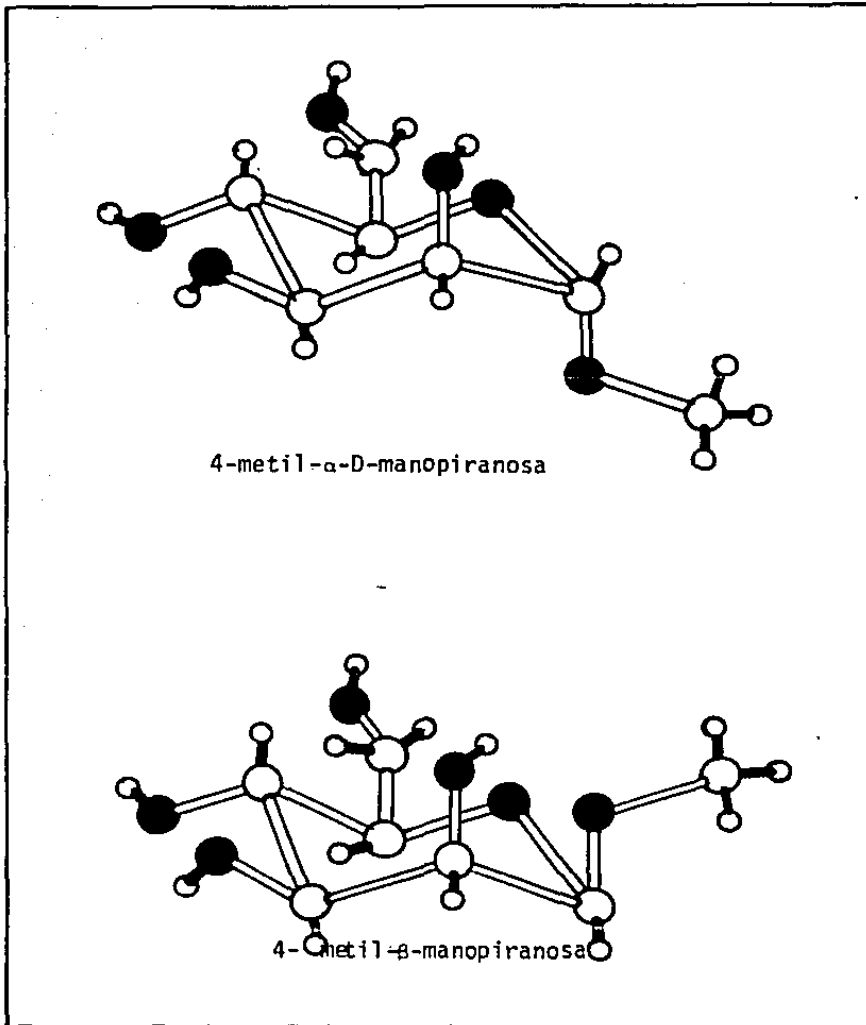


FIGURA 17: Las configuraciones de la D-manopiranosas.

Ahora bien, un estudio a fondo de la estereoespecificidad de esta protefna a travs de una tcnica muy utilizada para ello (tcnica de

de Landsteiner) que consiste en determinar cuáles son las diferencias en el poder inhibitorio de un azúcar modificada, es decir, un azúcar sustituida, ha mostrado una gran cantidad de hechos acerca de este fenómeno^{33}.

Por otra parte se tiene que las modificaciones en el pH o en la fuerza iónica, afectan la formación del complejo sacarido-lectina de la siguiente manera: A mayor pH, menor constante de equilibrio de formación del complejo. A menor pH, mayor valor de la misma constante; a su vez, cuando se aumenta la fuerza iónica el valor de la constante disminuye y cuando la fuerza iónica disminuye la formación del complejo se favorece^{35}. Al parecer, cuando la proteína se trata con grupos o radicales de gran polaridad el complejo se estabiliza. Lo anterior permite concluir que la formación del complejo proteína-sacárido se estabiliza por medio de las interacciones dipolo-dipolo y se desestabiliza ante las interacciones carga-carga.

Además de las reacciones de esta lectina con los α -glico y manopiranosidos, se ha observado que en el sitio reactivo de esta proteína también reacciona con algunos sacáridos de cinco anillos tales como, α -D-fructofuranósido y aún cuando esta interacción es considerablemente menor, ello es explicable en términos de la similitud del anillo en las dos clases de sacáridos.

Desafortunadamente, el enlace entre la proteína y el sacárido no se ha podido estudiar por medio de los métodos cristalográficos de rayos-X, ya que el complejo proteína-sacárido se ha resistido a la crista-

lización. Lo anterior ocurre aún cuando se ha tratado la proteína con concentraciones muy altas de sacáridos para favorecer la formación del complejo. Este efecto, al parecer, está asociado a un cambio conformacional para la formación del complejo.

E) EXAMEN CUANTITATIVO DE ALGUNAS DE LAS REACCIONES:

La medición de parámetros tanto cinéticos como termodinámicos de la concanayalina-A y diversos sustratos, se ha efectuado concienzudamente con el objeto de poder comprender algunos de los mecanismos del enlace de la proteína.

Ahora bien, como en todas las reacciones químicas, la posibilidad de medir estos parámetros dependerá las propiedades que sufran algún cambio como consecuencia de la reacción por una parte y cuán notorio sea este cambio por otra. Por esto mismo, generalmente serán más fáciles de medir los parámetros termodinámicos que los cinéticos. Lo anterior ocurre por que cuando se mide algún parámetro termodinámico, v.gr. la constante de equilibrio de alguna reacción, no es importante que el cambio medido sea de gran magnitud, sino más bien, que este cambio aún cuando sea pequeño, pueda diferenciar entre dos estados particulares de la reacción id est, los asociados a los estados inicial y final de esta. Sin embargo, cuando se hace la medición de algún parámetro cinético, es imprescindible que el cambio asociado a esta muestra, no sólo los estados inicial y final de la reacción sino que además muestre

como ocurre este cambio respecto al tiempo.

Así se tiene, que en el caso de la concanavalina-A lo anterior debe de tomarse en cuenta, además de ciertas consideraciones específicas propias de la lectina. A este respecto se tiene que los sustratos que presentan mayor interés dentro del estudio de la concanavalina-A, serán aquellas que tengan las características siguientes:

i) Que sean buenos inhibidores de la reacción con polisacáridos. Esto es con objeto de asegurar que la reacción tenga una constante de estabilidad grande.

ii) Que tengan conformaciones que permitan equipararles con los carbohidratos superiores con los que reacciona y aún con los componentes de la membrana celular.

Lo anterior tiene también por objeto el poder explicar, tanto la especificidad de la proteína, como algunos de los mecanismos de acción biológica de la misma. En esta categoría se encuentra 4-metil-D-manopiranososa, la cual tiene una serie de características que la hacen ideal para muchos de los estudios mencionados.

La 4-metil-d-D- manopiranososa es un sacárido que se puede encontrar en ciertos polisacáridos de la membrana celular. A la vez se ha observado que inhibe muchas de las reacciones de la concanavalina-A con sacáridos superiores y con células, mientras que el isómero β no es inhibitorio de ninguna de las reacciones ⁽³⁴⁾ (Vease la figura 17)

Evidentemente, los primeros estudios de la reacción entre la conca-
 navalina-A y este monosacárido se efectuaron para determinar la afini-
 dad de éste por la proteína. Estos mostraron^[37], por medio de la técni-
 ca de Landsteiner, que la proteína tiene una gran afinidad por este sa-
 cárido en particular y por algunos de sus derivados metilados. Poste-
 riormente So y Goldstein (1968)^[36], determinaron la constante de esta-
 bilidad o de asociación de la reacción siguiente:



la cual es del orden de $0.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ a 25°C. La técnica utilizada para
 la determinación de la constante mencionada es la llamada "equilibrio
 por diálisis". A través del mismo estudio se determina la variación de
 esta constante con la temperatura y por medio de ello los valores de
 ΔG , ΔH y ΔS . Estos valores se pueden ver en la tabla IX. Desafortunada-
 mente esta reacción (y muchas con derivados de este sacárido) presenta
 el inconveniente de no tener ninguna propiedad medible que pueda asociar-
 se con el cambio de reactivos a productos, con la excepción ya hecha,
 de la determinación de la entrada o salida de productos a través de una
 membrana dializante. Con ello, el estudio de los parámetros de esta reac-
 ción queda restringido a la determinación de la constante de estabilidad
 ya descrita.

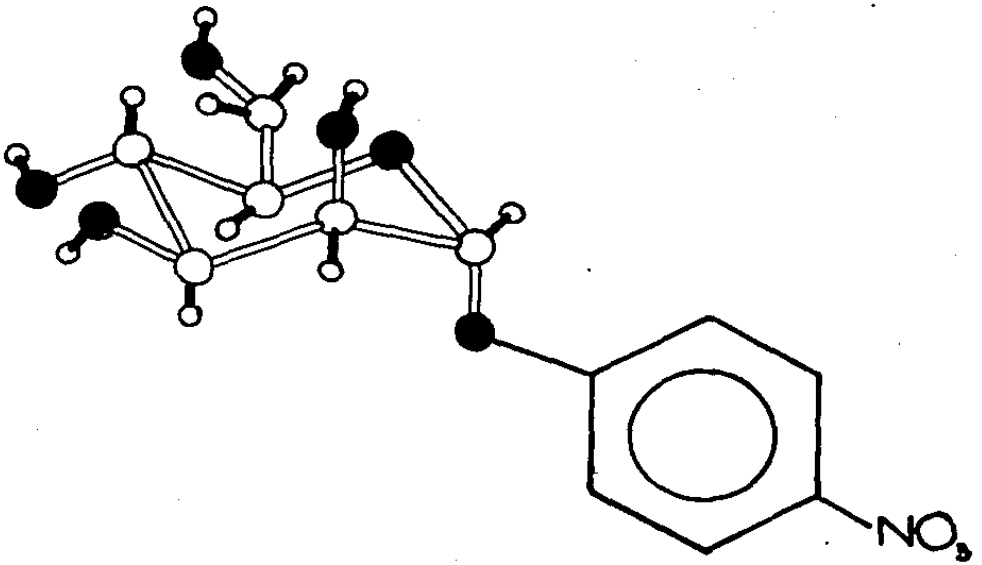
Sin embargo, existen una serie de derivados de este sacárido que
 han sido sintetizados expresamente con el objeto de poder determinar las
 características de reactividad entre los sacáridos y la conca-
 navalina-A,

TABLA IX
Funciones termodinámicas para la
reacción:

S= sacárido	$10^{-4} \times K (M^{-1})$	$-\Delta H^\circ$	$-\Delta G^\circ$	$-\Delta S^\circ$
4-metil- α -D-manopiranososa	0.90	6.1	5.4	2.3
p-nitrofenil- α -D-manopiranososa	1.49	6.8	5.7	3.6
4-metil-umbeliferil- α -D-manopiranososa;	4.26	8.5	6.3	7.4

que con la 4-metil- α -D-manopiranososa, no se habían logrado determinar. Estos derivados tienen al menos una propiedad detectable que puede asociarse con el cambio de la reacción en que toman parte.

Uno de estos derivados es la para-nitrofenil- α -D-manopiranososa (vease la figura 18) la cual, tiene al menos, dos propiedades detectables que varían durante la formación del complejo con la concanavalina-A. Estas son, la absorción de radiación en la región del ultravioleta ($\epsilon = 10^4 \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$ en $\lambda_{\text{max}} = 305 \text{nm}$) y el potencial de reducción del compuesto. La primera varía al interactuar con la proteína este derivado del monosacárido original, para formar el complejo. Lo anterior permite determinar cuál es el cambio de la concentración, ya del reactivo, ya del producto. La segunda se presenta por que este compuesto tiene un potencial de reducción dependiente de la concentración y que es muy diferente al potencial que presenta la especie que ha formado el complejo. Por tanto se puede diseñar un experimento en el cual partiendo de un potencial base, se pueda medir el cambio en la intensidad de corriente conforme avanza la reacción



4-p-nitro- α -D-manopiranoside.

FIGURA 18

Haciendo uso de la primera técnica, Loontjens et al^[38]. Determinaron cual es el valor de la constante de formación del complejo con la concanavalina-A:



la cual es del orden de $1.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, que como se vé, es ligeramente mayor que la del derivado metilado.

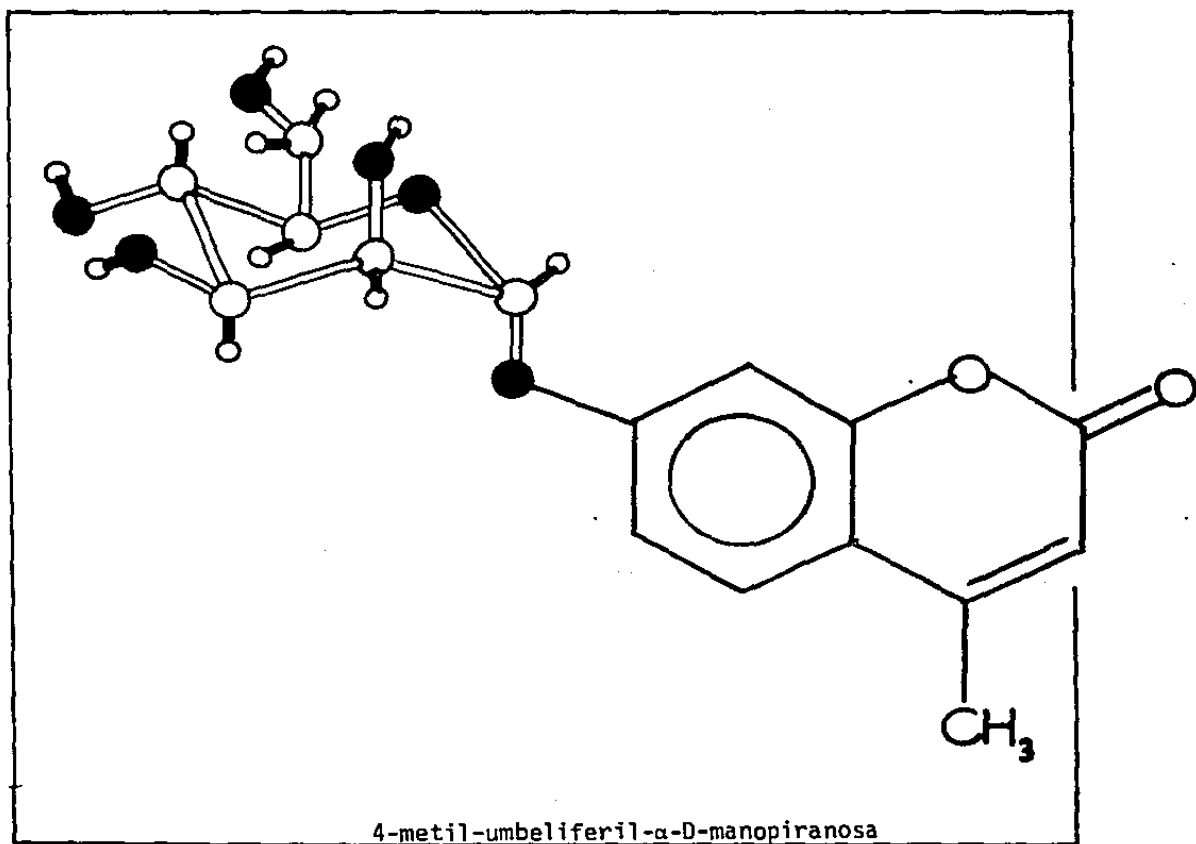


FIGURA 19

Finalmente, se tiene otro derivado del 4-metil- α -D-Manopiranosido, este derivado es el 4-metilumbeliferil- α -D-manopiranososa, el cual ha sido exhaustivamente utilizado en la determinación de las propiedades del sitio activo de las proteínas que reaccionan con sacáridos^[39]. En particular ha sido utilizado con la concanavalina-A debido a su gran afinidad, no solo para detectar cambios de las propiedades asociadas a la formación del complejo sacárido-proteína, sino para determinar toda aquella interacción entre la proteína y otros agentes. La 4-metil-umbeliferil- α -D-manopiranososa, es un derivado etiquetado con una molécula fluorescente cuya estructura se muestra en la figura 19.

La característica esencial de este derivado y que lo hace tan útil para una gran cantidad de determinaciones asociadas con la formación del complejo con la proteína, es el que pierde la fluorescencia al reaccionar con la proteína. Lo anterior permite, detectar de una manera particularmente sencilla, tanto la concentración del sacárido libre en el equilibrio, como el cambio de esta respecto al tiempo.

En un trabajo que consta de dos partes, Loontjens, Clegg y colaboradores^[39, 40] determinan, tanto la constante de equilibrio para la formación del complejo, como los parámetros cinéticos que caracterizan la misma. Así, haciendo uso de la fluorescencia y la absorción en la región de U.V., determinan la constante de equilibrio midiendo la intensidad de la fluorescencia o de la absorción, antes y después del equilibrio; relacionándola con la concentración. Y a través del uso de una técnica de relajación (temperature jump o salto de la temperatura) y

aprovechando el cambio de la intensidad de la fluorescencia, determinan la desaparición del sacárido con respecto al tiempo y con ello calculan las constantes de velocidad de la reacción. El mecanismo propuesto, el valor de la constante de estabilidad así como los valores de G° , H° , y S° ; se muestran en la tabla IX. Por otra parte la variación de la fluorescencia respecto a la concentración, se muestran en la figura 20.

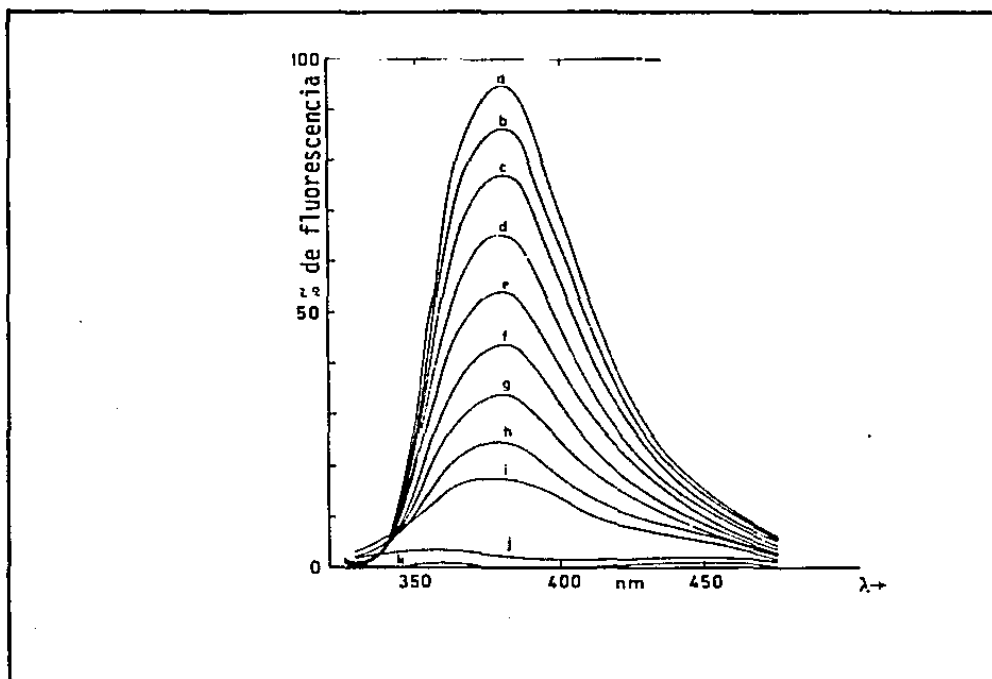
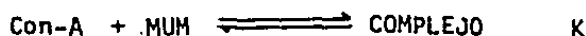


FIGURA 20: Variación del % de emisión fluorescente de la 4-metil- α -D-manopiranososa respecto a la concentración (desde concentraciones de $10^{-7}=k$, hasta $10^{-1}=a$) para un barrido de λ de 300 a 450 nm.

El mecanismo propuesto para la obtención de las constantes de velocidad es:



en donde, si se conocen las concentraciones en el equilibrio de ambas especies $|\text{Con-A}|_e$ y $|\text{MUM}|_e$ se puede determinar, a través del tiempo de relajación τ cuales son las constantes de velocidad de la reacción, a través de la siguiente relación:

$$\frac{1}{\tau} = k_1 (|\text{Con-A}|_e + |\text{MUM}|_e) + k_{-1}$$

en donde, las concentraciones en el equilibrio, se calculan por medio de la constante de equilibrio de la reacción.

F) LAS INTERACCIONES DE LA CONCAVALINA-A Y ALGUNOS IONES METALICOS

Como ya se ha indicado antes, la concavalina-A es una proteína que tiene dos diferentes cofactores. Ambos son metales, el Ca^{2+} y el Mn^{2+} . Estos metales son esenciales para la actividad tanto química como biológica de la proteína. La primera observación al respecto fue efectuada por Sumner y Howel en el año de 1936^(23c). Estos observaron que si a una solución de la proteína se le cambiaba el pH a un valor por debajo de 1 y posteriormente se neutralizaba, la proteína perdía por completo su capacidad para aglutinar glicógeno. Sin embargo, si la

solución se dejaba reposar por un par de horas, la proteína recuperaba la capacidad original para aglutinar el glicógeno de la solución.

Por otra parte, también se observó que cuando una solución de proteína se sometía a una diálisis ácida, entonces se perdía por completo la capacidad mencionada, recuperándola sólo si se reagregaba la solución exterior de la diálisis y se neutraliza.

Estas observaciones los llevaron a la detección de los metales mencionados, en las soluciones exteriores de la diálisis efectuadas y posteriormente, a la asignación de éstos a la propia proteína.

Más tarde, el mismo autor Sumner^(23a) procede al estudio del comportamiento de la apoproteína frente a otros metales. De las observaciones efectuadas puede concluir que para el caso de los iones como: El Ni^{2+} el Co^{2+} , el Mn^{2+} y el Zn^{2+} ; se produce un complejo metal-proteína cuya actividad es equivalente a la de la proteína nativa, sin embargo los iones como el Sr^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} , Li^+ y Na^+ ; no producen un compuesto activo al menos en una proporción cualitativamente detectable respecto a los iones anteriores.

El hecho de que el trabajo anterior adolezca de varios defectos, tales como la falta de pureza de la proteína y la clase de técnicas para la detección de los iones metálicos, no disminuye la altísima calidad del mismo, considerando la época en que se llevó a cabo.

A pesar del gran avance efectuado por Sumner, el tema de la función del metal en la concanavalina-A queda olvidado hasta 1969 fecha en que Nicolau y colaboradores^{50}, haciendo uso de técnicas tan elaboradas como E.P.R., logran obtener los siguientes datos acerca del enlace metal ligante:

1° Los metales de transición de la 1ª serie, tales como Ni^{2+} , Co^{2+} o bien Zn^{2+} , previenen la entrada del Mn^{2+} a la proteína si se agregan a una solución de la apoproteína. Lo anterior les lleva a concluir que la concanavalina-A tiene un sitio específico para algún ión de la primera serie de transición.

2° Los iones tales como Ca^{2+} no pueden impedir la entrada de los iones de los metales de transición y en particular la entrada del Mn^{2+} . A la vez observan que la entrada del Ca^{2+} cuando la proteína ya tiene Mn^{2+} , cambia el espectro de este. Lo anterior les lleva a concluir que existe un cambio en el sitio del metal de transición al entrar el Ca^{2+} . Al analizar el cambio espectroscópico observado, sugieren un aumento de la simetría del sitio del metal de transición. Finalmente los autores postulan que la entrada del calcio a la proteína que previamente se ha hecho reaccionar con un metal de transición de los ya indicados (vide supra), induce un cambio conformacional de la proteína.

Estos estudios llevaron a otros investigadores al estudio de la interacción metal-proteína intentando todos ellos caracterizar ambos sitios metálicos.

Entre los estudios señalados se pueden mencionar los efectuados

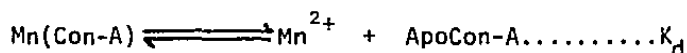
por McCubbin et al^{51}, los cuales, por medio de observaciones del espectro de dispersión óptica rotatoria de la apoproteína, a la cual se le agrega un sacárido posteriormente a la adición secuencial de Ca^{2+} y Mn^{2+} ; encuentran que la entrada del Ca ocasiona solamente una variación muy ligera del espectro, mientras que la del Mn^{2+} sí le produce un cambio mucho mayor del mismo. Lo anterior les conduce a proponer que la entrada del Ca solamente afecta a las cadenas laterales, mientras que la entrada del metal de transición, en este caso Mn^{2+} , involucra en definitiva la estructura secundaria de la proteína.

Otros estudios, como el efectuado por Gachelin y colaboradores^{52}, caracterizan un compuesto de la concanavalina-A y el Ni^{2+} , en el cual este metal sustituye al Mn^{2+} y activa a la proteína.

Además de los anteriores estudios se encuentra el efectuado por Glew^{53}, el cual, por medio del estudio espectroscópico de la concanavalina-A en la región del U.V., con una técnica de alta resolución, muestra que al agregar solamente Mn existe una diferencia ligera en la señal en esta región, y cuando se agrega el Ca la diferencia de la señal se hace mayor. Sin embargo, los resultados obtenidos son poco confiables, ya que comete un error en las mediciones de la concentración del metal. A pesar de ello, este trabajo permite tener una idea cualitativa acerca de las velocidades de entrada de ambos metales. Estas, según este trabajo, son como sigue: la de Ca \gg Mn.

Sherry y Cottam^{54}, por medio de varias técnicas (R.M.N., B.P.E.,

fluorescencia de lantánidos), muestran varias características del enlace metal-proteína, entre las que se encuentran el número de sitios por protómero para la unión metal-proteína esto es, uno para el calcio y uno para el metal de transición. Además, determinan los valores para las constantes de disociación del complejo formado por el metal de transición y la proteína en presencia y en ausencia de calcio. El esquema de reacción propuesto por estos autores es:



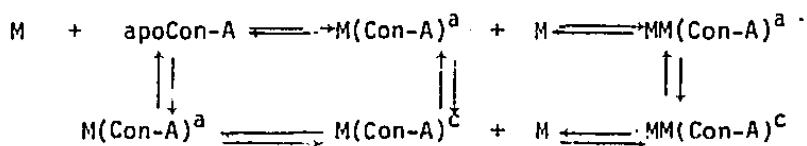
Los valores de la constante para la reacción anterior son de 5×10^{-5} en ausencia del Ca^{2+} y de 10^{-5} en presencia de este metal. Estos resultados indican que el Ca produce un cambio en la proteína que la lleva a un estado más estable. Aparentemente este cambio es conformacional.

Grimaldi y Sykes^{55}, basándose en el trabajo anterior y utilizando la técnica de 'stopped flow' acoplado a un aparato de resonancia magnética nuclear, llevan a cabo un análisis cinético de la interacción metal proteína, proponiendo varios mecanismos probables para esta interacción. Sin embargo, estos mecanismos no quedan sustentados adecuadamente, pues los datos cinéticos obtenidos no son suficientemente claros.

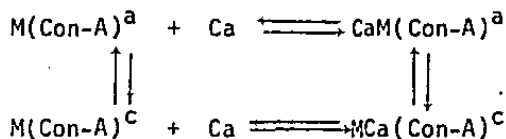
Más tarde, Ricardson y Benhke^{56} efectúan un estudio de las interacciones entre la proteína y el Co^{2+} , Mn^{2+} y el Ca^{2+} . Este estudio se hace a través de las observaciones en el espectro de dicroísmo circular de la proteína. Esta presenta la posibilidad de activación parcial

con algunos de los metales de transición ya en ausencia, ya en presencia del Ca^{2+} . En este estudio se hace una primera aproximación al estudio cinético de la entrada de los metales a la proteína.

Sin embargo, no es sino hasta el trabajo efectuado por Brown y colaboradores {57}, en el que se determinan estos parámetros y se propone un mecanismo consistente con ellos. El método utilizado consiste en el uso de una técnica de relajación de resonancia magnética nuclear protónica, en el que se observa el tiempo de relajación protónica en varias frecuencias de excitación. Las condiciones de pH y temperatura son las siguientes: $5.3 < \text{pH} < 6.4$ y $5 \text{ C} < T < 25 \text{ C}$. Los autores consideran dos hipótesis de trabajo para la postulación del mecanismo, estas son: el Mn^{2+} produce un cambio conformacional en la concanavalina-A al unirse a ésta, este cambio es muy lento y sólo puede acelerarse en presencia de Ca^{2+} . Con estas dos hipótesis los autores proponen el mecanismo representado por el esquema siguiente:



que en presencia de Ca^{2+} , debe producir un equilibrio adicional:



donde los superíndices a y c representan las especies abierta y cerrada respectivamente.

Los esquemas anteriores son probados con diversas concentraciones de los reactivos. Además de los esperados cambios en el comportamiento de las interacciones ocasionados por la variación de pH y temperatura, los autores encuentran que la proposición de los dos estados conformacionales es consistente con los datos experimentales y a través del análisis de estos, concluyen que existe una barrera de potencial de potencial d - gran magnitud entre ambas conformaciones.

Apoyando las hipótesis de Brown y colaboradores, dos grupos de investigación, en forma independiente el uno del otro^{58, 59}, muestran que la concanavalina-A nativa difiere de la proteína desmetalizada en su estructura y esto se puede explicar en términos del cambio conformacional sugerido por Brown. A la vez, también se puede explicar la inactivación de la proteína desmetalizada arguyéndose el cambio de las distancias relativas entre los átomos que componen el sitio activo, ocasionado por el cambio en la morfología de los sitios metálicos al perder cada uno el metal correspondiente. Las conclusiones en ambos estudios son casi idénticas.

CAPITULO VI

PARTE EXPERIMENTAL

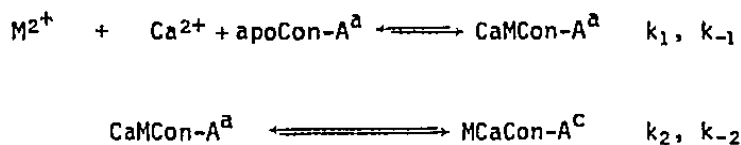
CAPITULO VI

1) ANTECEDENTES

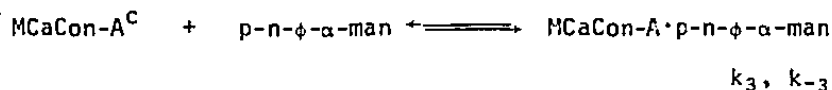
A raíz de la publicación del estudio de Brown y colaboradores^{57} se inician una serie de trabajos relacionados con el tema de las interacciones metal-proteína y del enlace metálico en la concanavalina-A, que tienen por objeto, aclarar la función de los metales en ésta. Debido a que este estudio se sustenta en varias de las suposiciones y determinaciones experimentales efectuadas en estos trabajos, conviene hacer un resumen que haga explícito cuales son estas suposiciones.

Uno de los primeros trabajos conectados con el tema es de Sherry et al^{50}, en el cual se sugiere, a partir de las proposiciones mecanísticas de Brown et al., que la entrada de los iones metálicos a la proteína procede a través de dos pasos básicamente: el primero un paso muy rápido, es el de la entrada de ambos metales a la proteína que si bien no la activa, si permite la posibilidad de un arreglo conformacional, el cual es el segundo de los pasos propuestos y que se produce como resultado de las interacciones entre los residuos aminoacídicos del sitio de coordinación y los iones metálicos al entrar a él. Este paso es muy lento si se compara al anterior. El mecanismo anterior puede es

quematzarse como sigue:



en donde M^{2+} puede ser Mn^{2+} , Co^{2+} o Zn^{2+} . Ahora bien para poder detectar el cambio en la concentración de la última especie, los autores emplean uno de los derivados de la metil- α -D-manopiranososa que por su gran reactividad frente a la proteína nativa y por sus propiedades es adecuado para estas determinaciones. Este es el p-nitro-fenil- α -D-manopiranososa (Vease la tabla IX), esta reacción puede presentarse como:



considerando el mecanismo anterior, haciéndole algunas simplificaciones obtienen los valores de las constantes de la reacción observando la variación de la concentración de la especie $MCaCon-A^C \cdot p-n-\phi-\alpha-man$ respecto al tiempo. Las consideraciones que los autores de este trabajo hacen se basan en el multicitado artículo de Brown et al. Así los autores suponen que tanto el ión metálico divalente como el calcio, reaccionan rápidamente con la proteína desmetalizada para llegar al equilibrio de manera tal, que esta reacción es mucho más rápida que la opuesta es decir la desmetalización de la proteína. De hecho este proceso es muy len

to (en el orden de horas) aún en condiciones de reacción severas, esto es, pH menor a 2 y temperaturas de 25 a 30 C. Por otra parte, en el equilibrio representado por k_2 , k_{-2} ; la primera de estas es mucho mayor que la segunda, esto es, la reacción se encuentra muy desplazada a la derecha de manera que se puede considerar que la conversión de $\text{M}(\text{CaCon})-\text{A}^{\text{C}}$ en $\text{CaMCon}-\text{A}^{\text{a}}$ es despreciable. Si además se considera que la velocidad de reacción de $\text{M}(\text{CaCon})-\text{A}$ con el sustrato es mucho mayor que la velocidad del cambio conformacional, o sea que $k_3 \gg k_2$, se puede entonces medir k , a través del cambio en la concentración del complejo sustrato-proteína respecto al tiempo. Los autores efectúan esta medición por medio de una técnica polarográfica, en la cual se mide el cambio en la corriente de difusión a potencial constante contra el tiempo. Dado que para el reactivo utilizado la concentración es proporcional a la corriente de difusión para el potencial empleado, entonces las mediciones son directas. (Vease la figura 21). Finalmente, a través de una serie de experimentos como el descrito y basándose en los argumentos aquí enunciados, los autores concluyen que la constante de la reacción que involucra el cambio conformacional, es decir k_2 es muy similar para los metales usados.

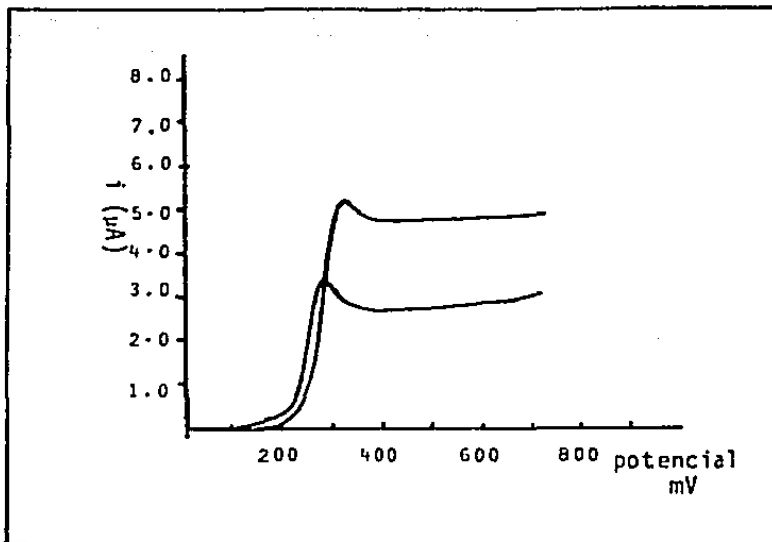


FIGURA 21a

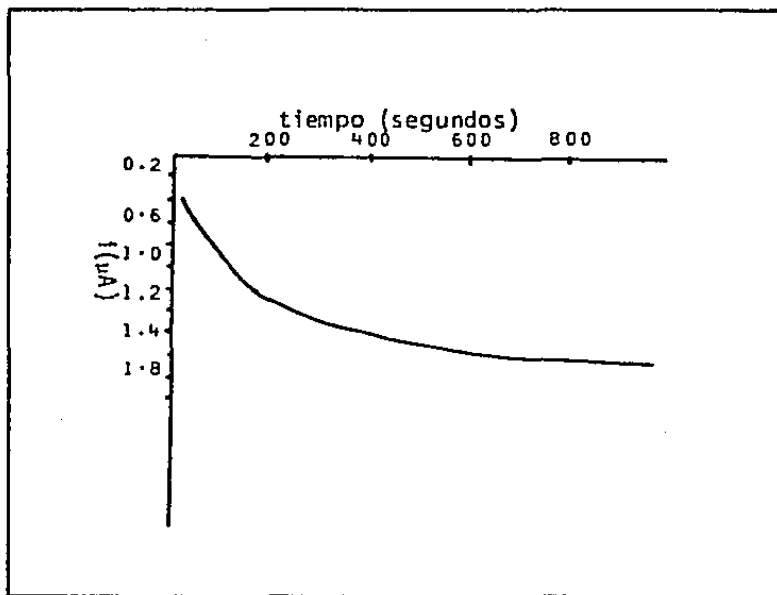


FIGURA 21b

Poco después Harrington y Wilkins⁽⁶¹⁾, utilizando un derivado del mismo sacárido pero ahora con una etiqueta fluorescente, logran obtener resultados consistentes con los reportados por Sherry et al. Para ello estos autores hacen previamente un análisis de las proposiciones que se habían obtenido del artículo de Brown et al., para poder argumentar el mecanismo que será propuesto por ellos. Este análisis se efectúa haciendo reaccionar varios derivados del α -D-manopiranosido con las formas metalizadas de la proteína, además de otras reacciones que se mencionarán en su debido momento. Las reacciones analizadas son entre el derivado fluorescente, el cual es la 4metil-umbeliferil- α -D-manipiranososa, (véase la figura 19) y la proteína nativa; la α -metil-D-manopiranososa y la proteína nativa. A partir del examen efectuado por estos autores, se proponen los siguientes mecanismos:



que ante un exceso de proteína la k_{obs} se puede escribir como:

$$k_{\text{obs}} = k_1 [\text{Con-A}] + k_{-1}$$

donde k_{obs} es de primer orden y refleja el avance de la reacción hacia el equilibrio. Las gráficas obtenidas para k_{obs} vs $[\text{Con-A}]$ resultan lineales (Véase la figura 22). Sin embargo, los autores consideran necesario hacer una medición más precisa de k_1 y esperando así el que se pueda comprobar el esquema. Esto se lleva a cabo por medio de una reacción entre el complejo sustrato-proteína, es decir, $\text{MUM} \cdot \text{Con-A}$ y otro derivado sacárido compitiendo por la proteína, en este caso el α -metil-D-manopiranososa designado en el esquema de reacción como MM.

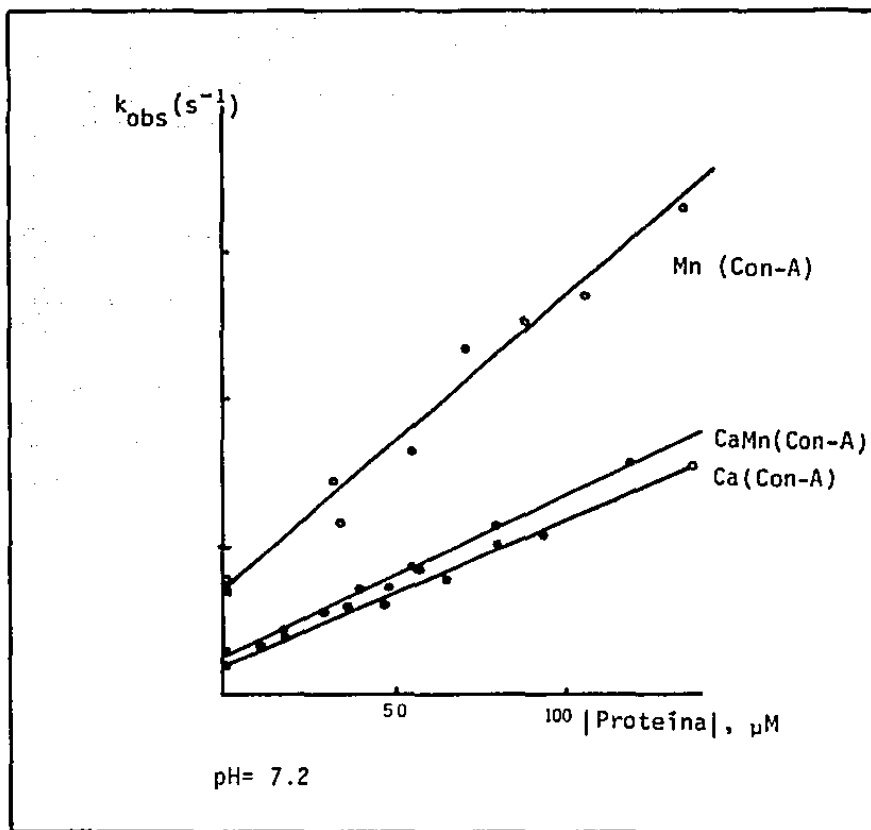
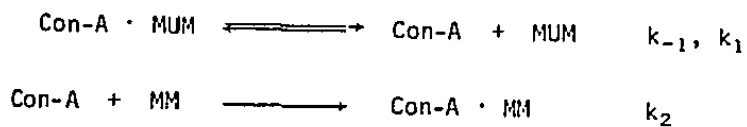


FIGURA 22: Gráficas de K_{obs} Vs concentración de la proteína para la reacción con varios metales.

El mecanismo propuesto se escribe a continuación:



en donde, para las condiciones en las que $k_2 [MM] \gg k_1 [MUM]$ se puede considerar que $k_{obs} = k_{-1}$. Siendo lo anterior observable a través del retorno de la fluorescencia del sacárido etiquetado al ser liberado del complejo sustrato proteína. Con esta serie de experimentos se encuentran los datos que se muestran en la tabla IX (ver capítulo anterior).

Un hecho interesante es el que los valores de las constantes de reacción para las dos clases de proteína usada esto es la nativa y la equilibrada con Ca y Mn, son virtualmente idénticos. Además cuando la concentración de éstos se hace variar respecto a la de la proteína se observa que, si su concentración excede en 10 veces o más a la de la proteína entonces los valores de k_{ob} resultan independientes a la concentración de los iones metálicos.

Así, a partir de los resultados obtenidos para una serie de experimentos efectuados con las formas desmetalizadas de la proteína, los autores proponen un posible mecanismo para la entrada de los iones metálicos a la apoproteína, justificado en términos de las siguientes observaciones:

1° Cuando a la proteína metálica se le añade un secuestrante de iones metálicos tal como el EDTA, se observa que la proteína va perdiendo su actividad original en el curso de varias horas. Lo anterior se puede atribuir a la pérdida de los iones metálicos al complejarse al EDTA.

2° Cuando a la apoproteína se le trata con uno solo de los iones metálicos que actúan como cofactores y al producto resultante de la reacción se le trata con el mismo secuestrante, el proceso para la pérdida del ión metálico es sustancialmente más rápido que el anterior.

3° Cuando a la apoproteína se le trata con ambos iones metálicos⁽⁶⁰⁾ el proceso de restauración de su actividad es lento. Si se deja llegar al equilibrio en presencia de un exceso de iones metálicos la mezcla se comporta de manera idéntica a la nativa.

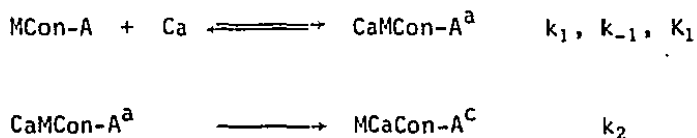
Con las observaciones anteriores se puede retomar el esquema propuesto por Brown et al., y simplificarlo de tal manera que ahora se puede efectuar un análisis concentrado en la manera en que el ión metálico interacciona con la proteína. El esquema que debe analizarse es el siguiente:



siendo esta última especie la que reacciona preferentemente con los sacáridos por ser la especie que tiene formado el sitio de unión del complejo proteína-sacárido. Esto es:



así dado que los valores de k_3 , k_{-3} y K_3 son mucho mayores que los de k_2 , k_{-2} y K_2 se pueden considerar que esta última reacción está controlada por la aparición de $\text{M}\text{Ca}\text{Con}-\text{A}^{\text{C}}$. Así, se puede suponer que este producto se puede detectar por medio de la última reacción (o sea por medio de la desaparición de la fluorescencia del sacárido etiquetado). Si el sacárido se encuentra en concentración mucho menor que la de la proteína en su forma final (es decir $\text{M}\text{Ca}\text{Con}-\text{A}^{\text{C}}$), entonces puede suponerse que solo se detectará el resultado de la combinación de la primera y de la segunda reacciones, pudiendo ahora simplificar el mecanismo propuesto tomando en cuenta que para concentraciones de Ca superiores a 10^{-4}M la formación del producto $\text{Ca}\text{Con}-\text{A}^{\text{C}}$ es completa^[61], de manera que se puede reconsiderar el esquema modificándolo, y como $k_2 \gg k_{-2}$, entonces se puede suponer a este paso como irreversible quedando entonces el esquema siguiente:



Este modelo permite expresar la constante de velocidad observada, como una función de la concentración del Ca^{2+} . Esta función tiene la forma siguiente:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_2 K_1 |\text{Ca}|}{1 + K_1 |\text{Ca}|}$$

Que es una ecuación hiperbólica. Esta puede transformarse a su vez en otra ecuación más manejable, que es lineal*;

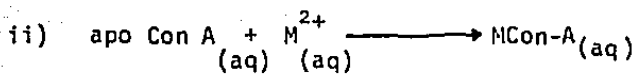
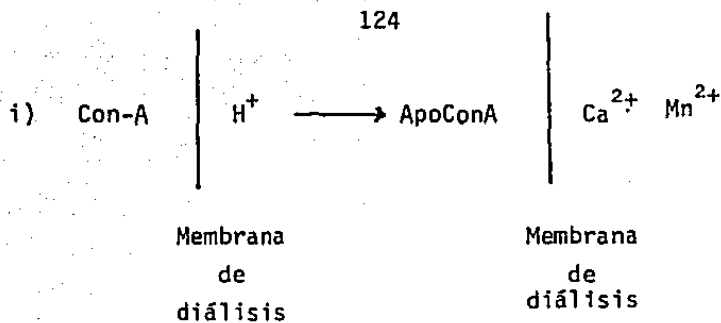
$$\frac{1}{k_{\text{obs}}} = \frac{1}{k_2} \frac{1}{K_1 [\text{Ca}]} + \frac{1}{k_2}$$

2) DISEÑO DEL EXPERIMENTO

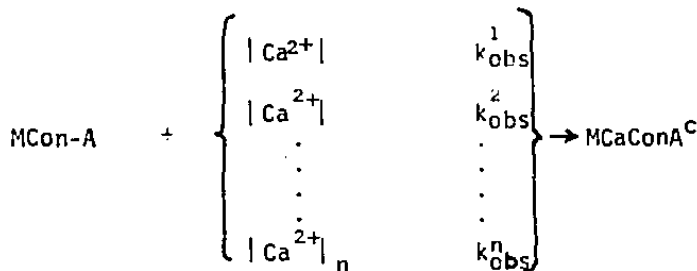
Partiendo del modelo propuesto por Harrington y Wilkins⁽⁶¹⁾ se diseñan una serie de experimentos que permitirán comprobar la validez del modelo propuesto. Con base en las hipótesis sugeridas en el modelo se procede a buscar las reacciones adecuadas para este. Así se tiene entonces que:

a) Dado que el método sugiere la formación cuantitativa de la proteína mono-metalizada con los iones de los metales de transición, previa a la reacción con el Ca^{2+} , se hace necesario prepararlas. Para ello es necesario formar previamente la apoproteína, la cual se hace reaccionar con las sales de cada uno de los iones deseados. Esto se presenta en el esquema siguiente:

*Nota: la discusión del modelo propuesto y el tratamiento para llegar a esta ecuación se muestran en el capítulo de discusión y resultados.



b) Ahora, considerando las características del mismo modelo y debido a la forma de la ecuación que surge de este, es decir, debido a que la constante de velocidad observada depende de la concentración del calcio, es necesario efectuar una serie de reacciones, entre la proteína monometalizada con diferentes concentraciones de Ca^{2+} , para poder conocer la forma de esta variación. Lo anterior se muestra en el esquema siguiente.



Para una misma concentración de la proteína mono metalizada y donde M puede ser Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} o Zn^{2+} .

c) Conociendo los valores de la k_{obs} para cada una de las diferentes concentraciones utilizadas de $\{Ca^{2+}\}$, estas dos cantidades se ajustan por medio de una regresión lineal. Cada concentración se prueba a 4 temperaturas.

d) La regresión anterior permite encontrar los valores de las constantes buscadas, es decir k_2 y K_1 y con estos valores se puede ajustar con otra regresión lineal, la variación de k_2 y K_1 , respecto a la temperatura. Así se pueden conocer los valores de los parámetros termodinámicos de la reacción.

3) DESCRIPCION DE LAS ETAPAS EXPERIMENTALES

a) Preparación de los reactivos.

a) Diálisis ácida: en un tubo de diálisis se pone una solución de ConA en NaCl (1:5.5.), en agua des-ionizada y destilada (2.5g/10mL). Este tubo se cierra y se sumerge en 1L de una solución de ácido acético 1M (57mL a. acético glacial/1L) a la temperatura de 4 C, con agitación. Este proceso dura 8 horas, transcurrido este tiempo, la solución exterior se cambia por una solución recién preparada con las mismas condiciones que la anterior. Este proceso dura 4 horas más.

b) Diálisis neutra: la bolsa de diálisis tratada en solución ácida durante 12 horas, se transfiere a una solución de NaCl 0.3M y

EDTA 10^{-3} M. Se agita durante 4 horas y se cambia por otra solución idéntica. El proceso anterior se repite una vez más, en las mismas condiciones.

c) Diálisis neutra: la bolsa de diálisis se transfiere a una solución de NaCl 0.3M. Se agita durante 12 horas, bajo las mismas condiciones que los dos tratamientos anteriores.

d) Centrifugación: debido a que el proceso de diálisis ácida produce la desnaturalización parcial de la proteína, es necesario centrifugar la solución de la bolsa de diálisis para separar la proteína que hubiese precipitado.

e) Filtrado: para eliminar todas las partículas de proteína que no se hubiesen aglutinado y por tanto que no se hubiesen separado con la centrifugación, se debe filtrar la solución. El filtro utilizado es un filtro número 0.08 de Millipore. El filtrado se desecha y la solución se almacena a 4 C para su uso posterior.

f) Disolución y ajuste de pH, fuerza iónica y concentración: la solución concentrada se lleva a 10mL con una solución de pH = 5 y fuerza iónica de 0.3M. (acetato de sodio: ácido acético 1:1 y NaCl 0.3M). De esta solución se toman 3 alícuotas que se usan como sigue:

1) 0.3mL de apoConA llevan a 2mL y se colocan en una celda de cuarzo en un espectrofotómetro, donde se mide la absorbancia de la mues

tra a los 280nm. La absorbancia registrada permite conocer la concentración de la apoConA si se considera que el coeficiente de extinción de la concanavalina al 1% en peso y 1cm de recorrido en esa longitud de onda ($E_{280nm}^{1\%}$) es de 12.4.

2) 1mL de la solución original se trata con ácido perclórico y calor durante tres horas. La solución resultante se lleva a un aparato de absorción atómica donde se determina la concentración de los iones Ca^{2+} y Mn^{2+} . Si la concentración observada resulta ser mayor al 3% del contenido metálico de la proteína nativa, se desecha la solución. En caso contrario se utiliza para las determinaciones.

3) 0.6mL de la solución original se hacen reaccionar con el azúcar 4-metilumbeliferil- α -D-manopiranososa para determinar su actividad. Si la actividad de la proteína desmetalizada excede el 6% del presentado por la nativa, la solución se desecha. Por lo contrario si la actividad presentada es menor al 6% de la nativa la proteína es utilizada.

g) Solución patrón caracterizada: si la solución original ha pasado las pruebas 2 y 3 entonces se puede almacenar (caracterizada). Esto se hace en plástico para evitar contaminación.

h) Reacción de la Apo-ConA y los metales de transición: esta reacción se lleva a cabo mezclando 10mL de la solución patrón de apo-

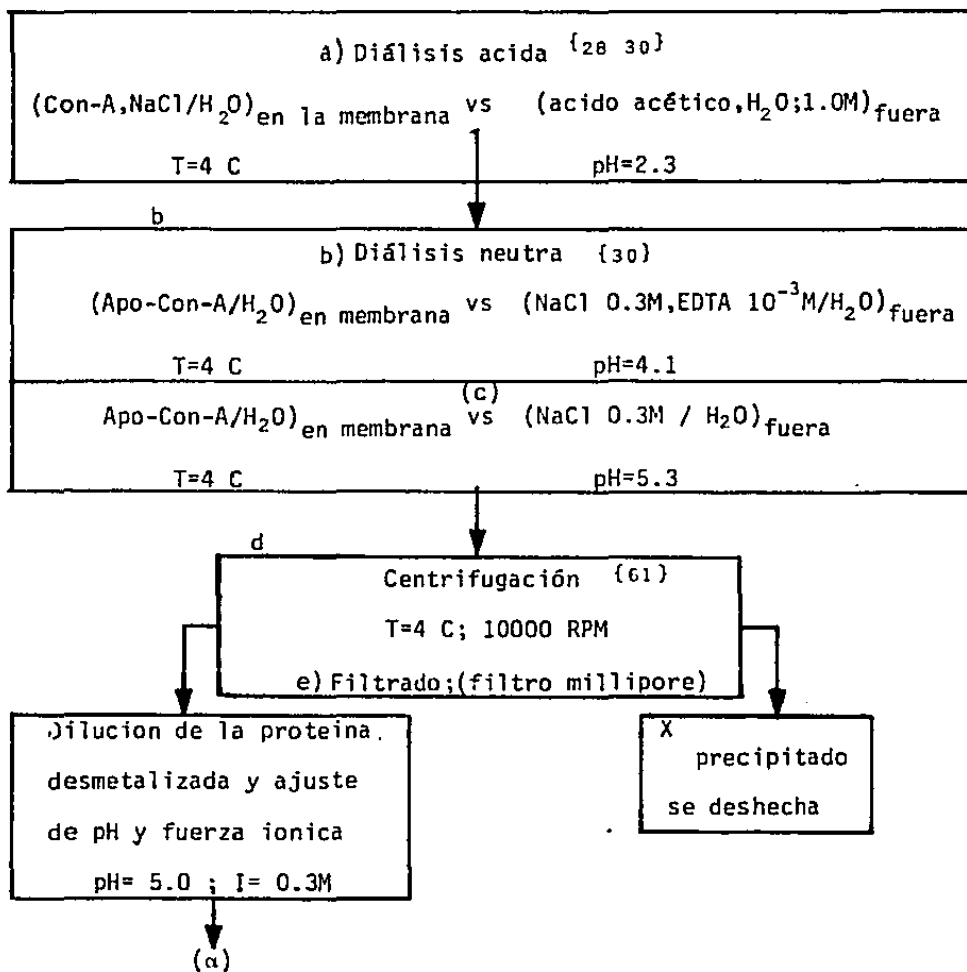
ConA con 1mL de una solución de los cloruros de los metales divalentes que se emplean para hacer las determinaciones. Las soluciones resultantes tienen una concentración de 15 μ M de la apoCon-A y 10mM de los iones metálicos. La fuerza iónica es de 0.3M y el pH de 5.0. Estas soluciones se dejan 16h como mínimo a una temperatura de 4°C listas para hacerlas reaccionar con el Ca²⁺.

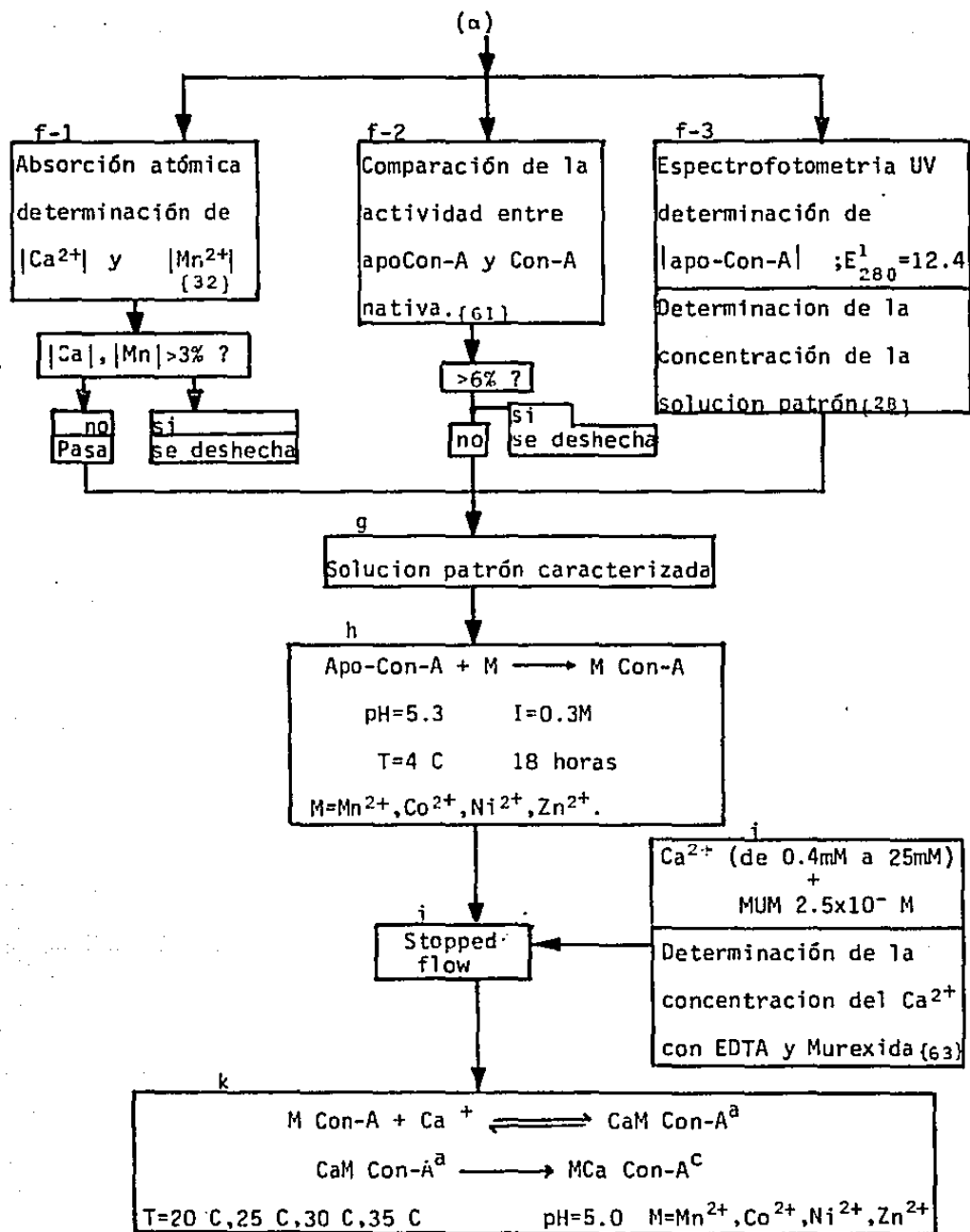
i) Soluciones de Ca²⁺: se prepara una solución patrón utilizando CaCO₃ (reactivo primario) y titulado con HCl 1.0M para formar cloruros. Esta solución permite preparar una serie de soluciones cuyas concentraciones van de 4mM a 25mM de Ca²⁺. Cada una de estas soluciones tiene una concentración del sacárido (MUM) de 1.5 μ M. La fuerza iónica y el pH son de 0.3M y 5.0 respectivamente. A las soluciones de mayor concentración se les titula con EDTA y murexida para determinar la concentración de Ca²⁺.

j) Reacción de Ca²⁺ + MCon-A: Esta reacción se lleva a cabo en la aparato descrito en el capítulo anterior, poniendo la mezcla indicada en (h) en una de las jeringas y la indicada en (i) en la otra.

k) La variación con la temperatura: cada una de las reacciones se hace a 4 temperaturas diferentes (20C, 25C, 30C, 35C), con objeto de conocer esta variación (dependencia).

Con el objeto de tener una descripción global del proceso experimental, se mostrará a continuación un diagrama de bloque en el cual se representan cada una de las etapas del proceso que se han descrito antes (vide supra). En este diagrama de bloques se pretende hacer explícita la interrelación de cada etapa con las demás.





4) REACTIVOS Y APARATOS UTILIZADOS

Reactivos: la concanavalina A fue comprada a sigma laboratorios, Inc., en forma de solución sólida ConA: NaCl (1:5.5), en peso. Los cloruros de los metales de transición fueron J.T. Backer grado reactivo. El carbonato de Ca para preparar las soluciones de CaCl_2 fue comprado también a J.T. Backer (reactivo primario). El ácido etilendiamintetracético fue comprado a Merck. La murexida y el monitor fluorescente 4-metilumbeliferil- α -D-manopiranososa se compraron a BDH inc.

Aparatos: el aparato de flujo fue un stopped flow marca Durrum Gibson acoplado a un osciloscopio Hewlet-Packard con almacenamiento de señales. Las regresiones lineales para calcular las constantes de la reacción se efectuan en una calculadora de bolsillo. T.I. 59 de Texas Instruments Inc. El espectrofotómetro usado fue un aparato Beckman 508.

CAPITULO VII

RESULTADOS Y DISCUSION

CAPITULO VII

1) INTRODUCCION

Cuando se examina una reacción de primer orden entre 2 reactivos A y B de la manera acostumbrada, es decir, uno de los reactivos se mantiene en exceso (B por ejemplo), la desaparición de A, usualmente será un proceso de primer orden, es decir, la constante de velocidad observada será una función logarítmica del tiempo. Ahora bien, cuando la concentración B es pequeña (pero aún mucho mayor que A), el valor de la constante resulta proporcional a la concentración de B. Sin embargo, cuando se incrementa la concentración de B, esta proporcionalidad desaparece y eventualmente el valor de la constante aparecerá independiente de la concentración de B⁽⁴¹⁾.

Así una primera revisión del comportamiento cinético de la reacción, permitirá sugerir un mecanismo para la reacción estudiada, siempre y cuando se tenga conocimiento del comportamiento químico de los reactivos.

2) EL MECANISMO PROPUESTO

Así en el caso de la reacción entre la concanavalina monometaliza-

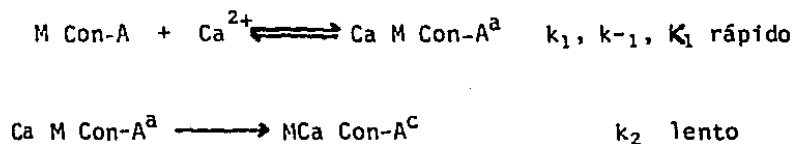
da con el ión divalente del Calcio se sabe lo siguiente:

i) La proteína y el calcio reaccionan lentamente para formar pro
ductos.

ii) Si el Ca^{2+} está en exceso (1:10 como mínimo) con respecto a la concentración de la proteína y se hace variar la concentración del mismo (manteniendo la concentración de la proteína constante) se observa en todos los casos, comportamiento logarítmico de la reacción. Y a la vez variación de la velocidad respecto a la concentración del calcio.

iii) Por otra parte según varios estudios cinéticos^(60,61) efectuados previamente, se puede sugerir la existencia de 2 posibles conformaciones de la proteína, dependiendo de si está o no metalizada. Lo anterior a su vez se ha demostrado por medio de estudios de difracción de rayos-X^(58,59) muy recientes, hechos a la proteína nativa y la apoproteina.

Lo anterior sugiere entonces un sistema bimolecular del tipo siguiente:



En donde se propone que la formación del producto final ocurra a través de 2 pasos. Uno de ellos (el primero) rápido y reversible y el

otro lento y prácticamente irreversible. Así se pueden identificar ambas etapas como sigue: la primera es una reacción en donde el calcio puede entrar y salir al sitio que le corresponde y la segunda etapa es un cambio conformacional lento que ocurre cuando ambos metales ocupan los sitios que les corresponden. Cuando este cambio ha ocurrido, la proteína puede reaccionar con el sacárido presente en la solución.

Ahora bien, en vista de que la reacción es bimolecular, es decir, que procede de acuerdo a la ley de velocidad empírica siguiente:^{66,67}

$$\frac{d|MCaConA^C|}{dt} = k_{obs} |MConA| |Ca| \dots\dots(1)$$

y que se considera que el equilibrio previo a la formación del producto final es muy rápido, es decir $k_{-1}, k_1 \gg k_2$, entonces se puede considerar que este equilibrio no está siendo afectado por la segunda etapa a lo largo de la reacción. Esto permite hacer una aproximación que facilita considerablemente la derivación de la ley de velocidad. La aproximación utilizada es la de considerar entonces que M Con A y Ca^{2+} estarán en equilibrio con $CaMConA^a$ durante toda la reacción, es decir que

$$\frac{|CaMConA^a|}{|MConA| |Ca|} = K_1 \dots\dots\dots(2)$$

se mantendrá constante. Y por tanto es posible considerar:

$$|CaMConA^a| = K_1 |MConA| |Ca| \dots\dots\dots(3)$$

Ahora como CaMConA^a es un intermediario en la reacción entonces:

$$\frac{d [M\text{CaConA}^c]}{dt} = k_2 [CaM\text{ConA}^a] \dots\dots (4)$$

Resultando ser un proceso de primer orden, siempre y cuando la condición de equilibrio sugerida, es decir, el estado estacionario, se cumpla. En caso contrario se tendrán desviaciones en el comportamiento observado.

Lo anterior permite entonces al sustituir (3) en (4) y obtener:

$$\frac{d [M\text{CaConA}^c]}{dt} = k_2 K_1 [M\text{ConA}] [Ca] \dots\dots (5)$$

la cual resulta indistinguible de la ley de velocidad observada.

Ahora bien, para conocer la dependencia de la velocidad de reacción respecto al Ca, es preciso efectuar ciertas transformaciones algebraicas, las cuales se indican a continuación:

El balance de masa para la proteína utilizada se puede escribir como:

$$M\text{ConA}_t = [M\text{ConA}] + [CaM\text{ConA}^a] \dots\dots (6)$$

Esto es, la concentración total de la proteína monometalizada es igual a la concentración de la proteína que haya reaccionado con el Ca²⁺, más la que no lo haya hecho.

Ahora bien, si se suma en ambos lados de la ecuación (3) el factor:

$(k_1 [Ca] [CaMConA^a])$ se tendrá:

$$[CaMConA^a] + (K_1 [Ca] [CaMConA^a]) = K_1 [Ca] [MConA] + (K_2 [Ca] [CaMConA^a]) \quad (7)$$

si esta ecuación se factoriza:

$$[CaMConA^a] + (K_1 [Ca] [CaMConA^a]) = K_1 [Ca] ([MConA] + [CaMConA^a]) \dots\dots\dots (8)$$

Si se sustituye (6) en la ecuación (8) se tendrá:

$$[CaMConA^a] + (K_1 [Ca] [CaMConA^a]) = K_1 [Ca] (MConA_t) \dots\dots\dots (9)$$

Si la ecuación (9) se factoriza:

$$[CaMConA^a] (1 + K_1 [Ca]) = K_1 [Ca] (MConA_t) \dots\dots\dots (10)$$

de tal manera que se puede despejar $[CaMConA^a]$ obteniéndose:

$$[CaMConA^a] = \frac{K_1 [Ca] (MConA_t)}{1 + K_1 [Ca]} \dots\dots\dots (11)$$

Si ahora se sustituye la ecuación (11) en la ecuación (4) se tendrá:

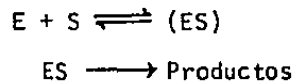
$$\frac{d[MCaConA^c]}{dt} = \frac{k_2 K_1 [Ca] (MConA_t)}{1 + K_1 [Ca]} \dots\dots\dots (12)$$

Ahora bien, si la concentración de $MConA_t$ se mantiene constante para todas las reacciones efectuadas se tendrá:

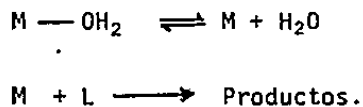
$$k_{obs} = \frac{k_2 K_1 [Ca]}{1 + K_1 [Ca]}$$

Siendo esta la ecuación que se propone para la determinación de k_2 y K_1 . Finalmente, debe indicarse que la situación descrita por el modelo sugerido se presenta en muchos casos. Cabe mencionar entre otros los siguientes:

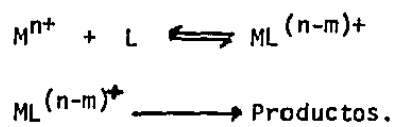
a) Reacciones catalizadas enzima-sustrato, las cuales están caracterizadas por la formación de un complejo entre la enzima E y el sustrato S. id est.^{41,42}



b) Reacciones de sustitución nucleofílica en los compuestos de coordinación^{41,43,9}



c) Reacciones de óxido-reducción a través de la formación de un compuesto de coordinación de esfera externa;{68,67,69}



3) ANALISIS DE LOS RESULTADOS

Para poder efectuar este análisis, es preciso considerar la ecuación resultante del esquema propuesto. Esto es:

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_2 K_1 |\text{Ca}|}{1 + K_1 |\text{Ca}|}$$

donde K_1 es la constante de equilibrio para el paso reversible rápido y k_2 es la constante de velocidad para el paso lento de la reacción, es decir la constante de velocidad de aparición del producto final.

La ecuación anterior es una ecuación de tipo hiperbólico. Esta puede transformarse a una ecuación lineal más manejable.

La transformación se efectúa tomando el inverso de la expresión antedicha, esto es:

$$\frac{1}{k_{\text{obs}}} = \frac{1 + K_1 |\text{Ca}|}{k_2 K_1 |\text{Ca}|}$$

o sea:

$$\frac{1}{k_{\text{obs}}} = \frac{1}{k_2 K_1} |\text{Ca}|^{-1} + \frac{1}{k_2}$$

Que como puede verse es una ecuación lineal respecto al inverso de la concentración del calcio.

Si se grafican entonces los inversos de los valores obtenidos de la k_{obs} contra los inversos de la concentración de Ca^{2+} utilizada, se debe esperar obtener una línea recta.

Si se hace entonces una regresión lineal con las parejas k_{obs}^{-1} , $|\text{Ca}|^{-1}$ se tendrá que los valores de las constantes del esquema de reacción pueden calcularse, ya que la pendiente de la recta obtenida en la regresión, correspondiente al inverso del producto de K_1 y k_2 y la ordenada al origen será el inverso de k_2 , es decir:

$$m = \frac{1}{k_2 K_1} \quad \text{y} \quad x' = \frac{1}{k_2}$$

por tanto

$$k_2 = \frac{1}{x'} \quad \text{y} \quad K_1 = \frac{x'}{m}$$

A continuación se muestran los valores de la k_{obs} y la concentración de Ca^{2+} para cada una de las temperaturas a las que se hicieron experimentos. (Ver tabla X.)

Los valores obtenidos de k_{obs} vs $|\text{Ca}|$ de la tabla (representados por los círculos negros en las gráficas) se grafican, obteniéndose las distribuciones mostradas en las figuras 23 a 26. Cada una de estas figuras corresponde a cada uno de los metales usados e incluye las gráficas de k_0 y $|\text{Ca}|$ para las cuatro temperaturas usadas.

TABLA X

[Ca]mM	Mn^{2+}			
	$10^3 xk_{obs}(20C)$	$10^3 xk_{obs}(25C)$	$10^3 xk_{obs}(30C)$	$10^3 xk_{obs}(35C)$
0.4	2.7	4.5	8.3	-----
0.8	5.0	7.15	13.3	-----
1.0	5.5	8.80	17.3	-----
11.0	13.2	18.2	29.9	-----
25.0	14.7	20.2	33.7	-----

[Ca]mM	Co^{2+}			
	$10^3 xk_{obs}(20C)$	$10^3 xk_{obs}(25C)$	$10^3 xk_{obs}(30C)$	$10^3 xk_{obs}(35C)$
0.45	4.15	5.5	9.42	11.2
0.75	5.3	7.0	14.05	17.25
1.3	8.1	11.35	17.34	20.7
8.5	13.75	18.40	32.1	38.4
25.0	17.9	22.01	39.9	46.1

[Ca]mM	Ni^{2+}			
	$10^3 xk_{obs}(20C)$	$10^3 xk_{obs}(25C)$	$10^3 xk_{obs}(30C)$	$10^3 xk_{obs}(35C)$
0.4	2.5	4.1	6.8	10.5
0.8	4.0	7.0	11.2	16.5
1.0	4.5	8.4	12.5	20.0
10.0	13.0	18.5	30.0	40.5
25.0	15.9	20.8	34.0	46.9

[Ca]mM	Zn^{2+}			
	$10^3 xk_{obs}(20C)$	$10^3 xk_{obs}(25C)$	$10^3 xk_{obs}(30C)$	$10^3 xk_{obs}(35C)$
0.45	2.3	3.7	5.26	7.84
0.75	3.3	5.7	7.19	11.3
1.3	4.5	8.2	11.5	14.6
8.5	10.9	15.8	21.7	34.4
25.0	14.1	18.4	26.3	38.5

FIGURA 23

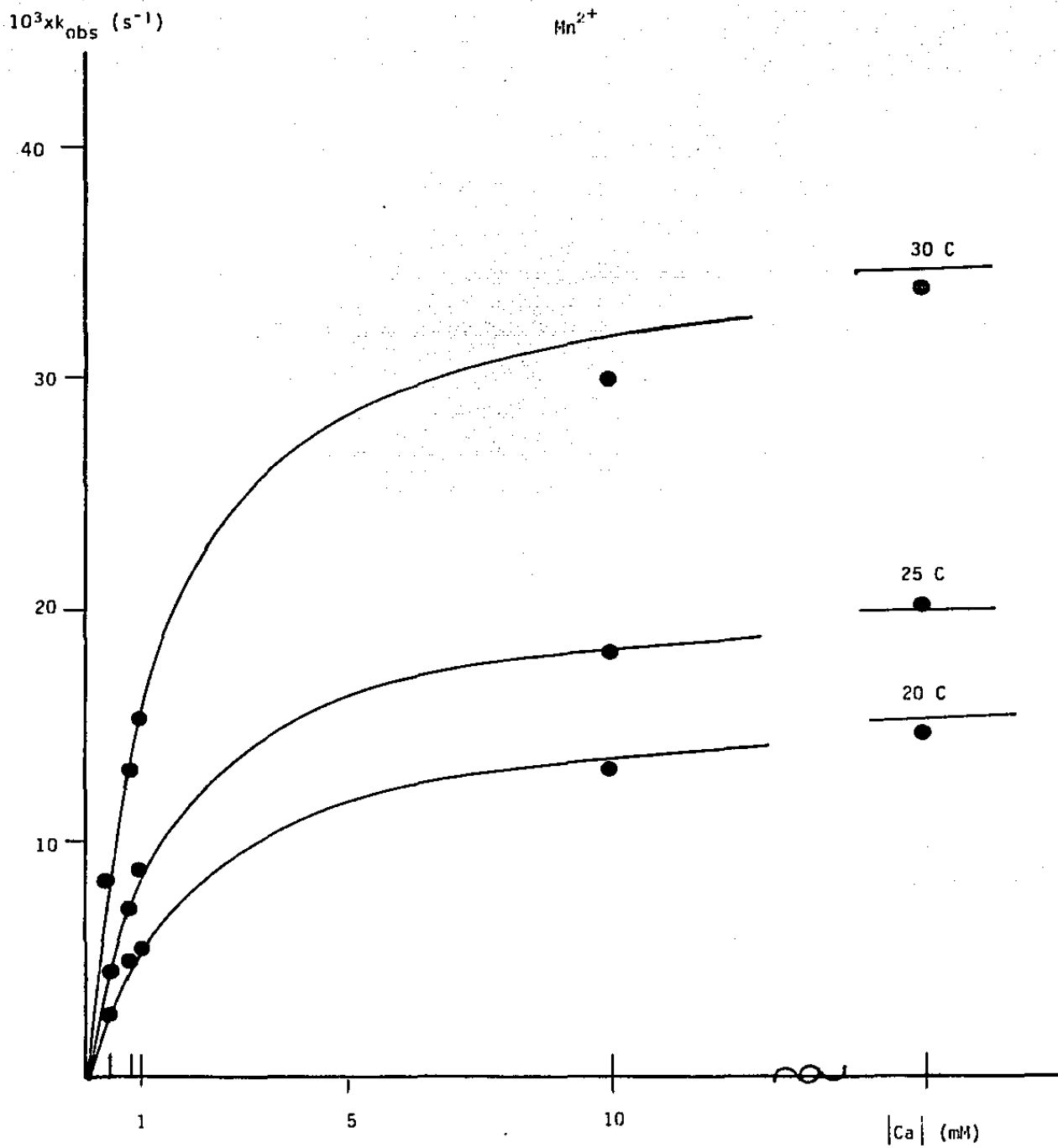


FIGURA 24
144
Co²⁺
FIGURA 24

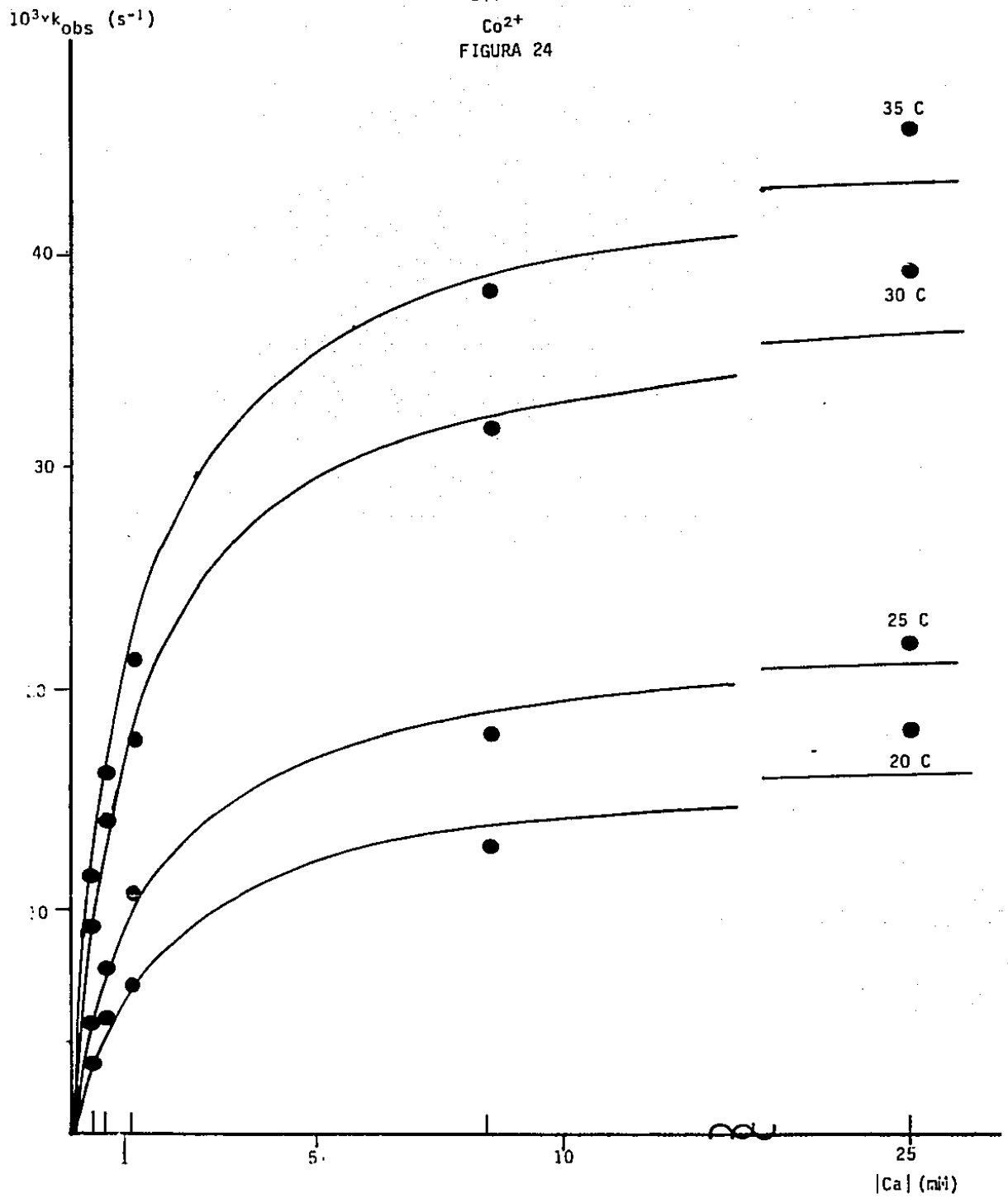


FIGURA 25

$10^3 \times k_{\text{obs}} \text{ (s}^{-1}\text{)}$

Ni^{2+}

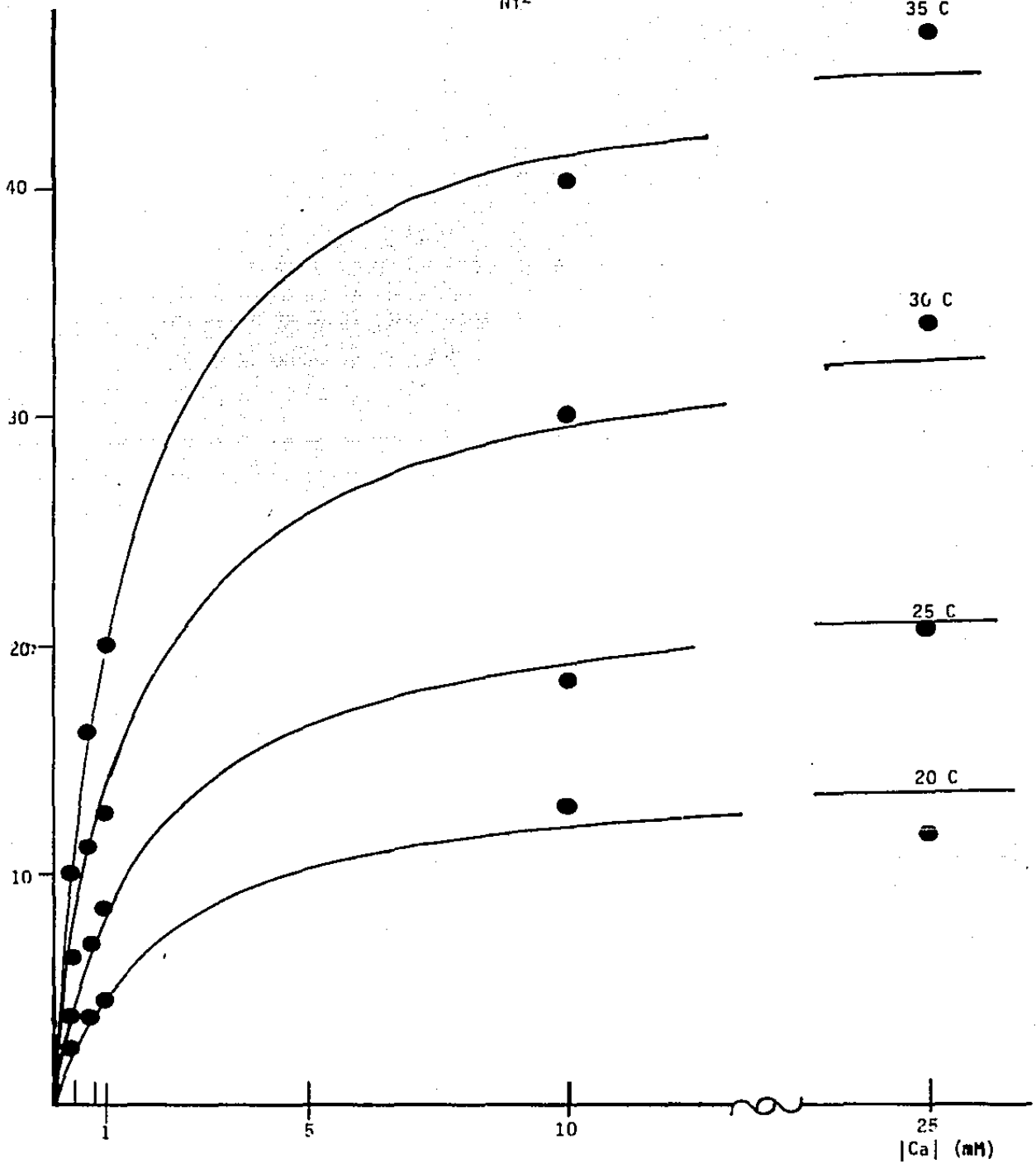
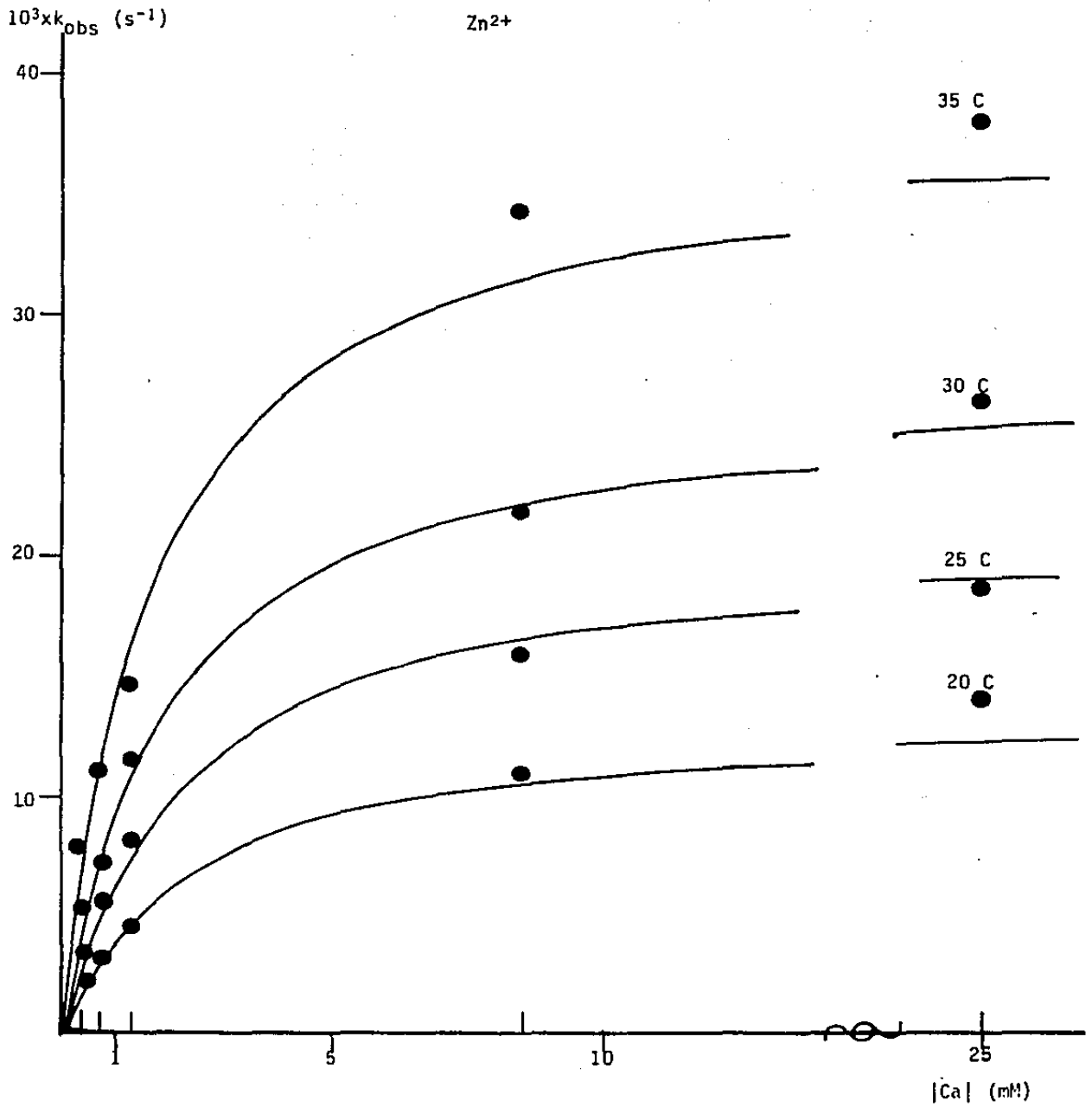


FIGURA 26



Ahora bien para poder evaluar k_2 y K_1 se deben efectuar las regresiones indicadas antes, con los valores de k_{obs}^{-1} y $|Ca|^{-1}$. En la tabla XI se enlistan los inversos de los valores experimentales de las parejas k_{obs} y $|Ca|$ para cada reacción.

Al graficar los valores calculados de k_{obs}^{-1} y $|Ca|^{-1}$ mostrados en la tabla XI (representados por círculos blancos en las gráficas) se obtienen las distribuciones que se muestran en las figuras 27-30 junto con la recta teórica que mejor ajuste tuvo, al hacer una regresión lineal con el método de mínimos cuadrados.

TABLA XI

$[\text{Ca}]^{-1} \text{ M}^{-1}$	Mn^{2+}			
	20C	25C	30C	35C
		k_{obs}^{-1} (s)		
2500	370.4	222.23	120.5	-----
1250	200.0	140.25	75.2	-----
1000	181.82	113.50	57.8	-----
100	75.76	55.00	33.5	-----
40	68.02	49.5	29.66	-----

$[\text{Ca}]^{-1} \text{ M}^{-1}$	Co^{2+}			
	20C	25C	30C	35C
		k_{obs}^{-1} (s)		
2222.23	242.1	181.85	106.1	89.36
1333.34	188.7	142.9	71.2	58.0
769.23	123.7	88.02	57.7	48.4
117.65	72.8	54.40	31.15	26.1
40.0	56.02	45.43	25.1	21.7

$[\text{Ca}]^{-1} \text{ M}^{-1}$	Ni^{2+}			
	20C	25C	30C	35C
		k_{obs}^{-1} (s)		
2500.0	400.0	244.0	148.0	95.23
1250.0	250.0	142.9	89.3	60.6
1000.0	222.23	119.04	80.0	50.0
100.0	77.0	54.05	33.34	24.7
40.0	63.2	48.1	29.4	21.3

TABLA XI (Continuación)

Ca ⁻¹ M ⁻¹	Zn ²⁺			
	k _{obs} ⁻¹ (s)			
	20C	25C	30C	35C
2222.23	434.78	270.30	190.12	127.55
1333.34	303.3	175.44	139.10	89.84
769.23	219.78	121.50	86.95	68.50
117.65	91.74	63.21	46.10	29.10
40.00	70.92	53.27	38.02	25.00

Los valores de la pendiente y la ordenada al origen de cada una de las rectas obtenidas por medio de las regresiones, se muestran en la tabla XII. En la misma tabla se presentan los valores calculados de K₁ y k₂ para cada una de las temperaturas utilizadas, debajo del metal al cual corresponde el experimento en cuestión.

TABLA XII

correlación	Pendiente	intercepcion	Mn ²⁺		Temperatura
			k ₂	K ₁	
0.9983	0.1217	60.2	0.0166	495	293°K
0.9989	0.0703	44.41	0.0225	632	298°K
0.9953	0.0366	27.54	0.0363	752	303°K

TABLA XII (continuación)

Co^{2+}					
correlación	pendiente	intercepción	k_2	K_1	Temperatura
0.9963	0.1084	57.40	0.0174	529	293°K
0.9971	0.0695	43.67	0.0229	628	298°K
0.9963	0.0356	26.09	0.0383	730	303°K
0.9951	0.0299	23.8	0.0420	797	308°K

Ni^{2+}					
correlación	pendiente	intercepción	k_2	K_1	Temperatura
0.9958	0.1376	68.2	0.0147	497	293°K
0.9995	0.0792	44.1	0.0227	556	298°K
0.9993	0.0481	28.9	0.0345	601	303°K
0.9990	0.0299	19.6	0.0510	655	308°K

Zn^{2+}					
correlación	pendiente	intercepción	k_2	K_1	Temperatura
0.9970	0.1660	75.22	0.0133	453	293°K
0.9993	0.0982	48.68	0.0205	495	298°K
0.9970	0.0706	36.77	0.0272	520	303°K
0.9959	0.0468	26.22	0.0381	560	308°K

Finalmente, si se sustituyen los valores de K_1 y k_2 en la expresión hiperbólica que define el sistema y se resuelve la ecuación para varios valores de concentración, se obtienen las curvas teóricas que se muestran como líneas sólidas en las figuras 23 a 26 inclusive.

FIGURA 27

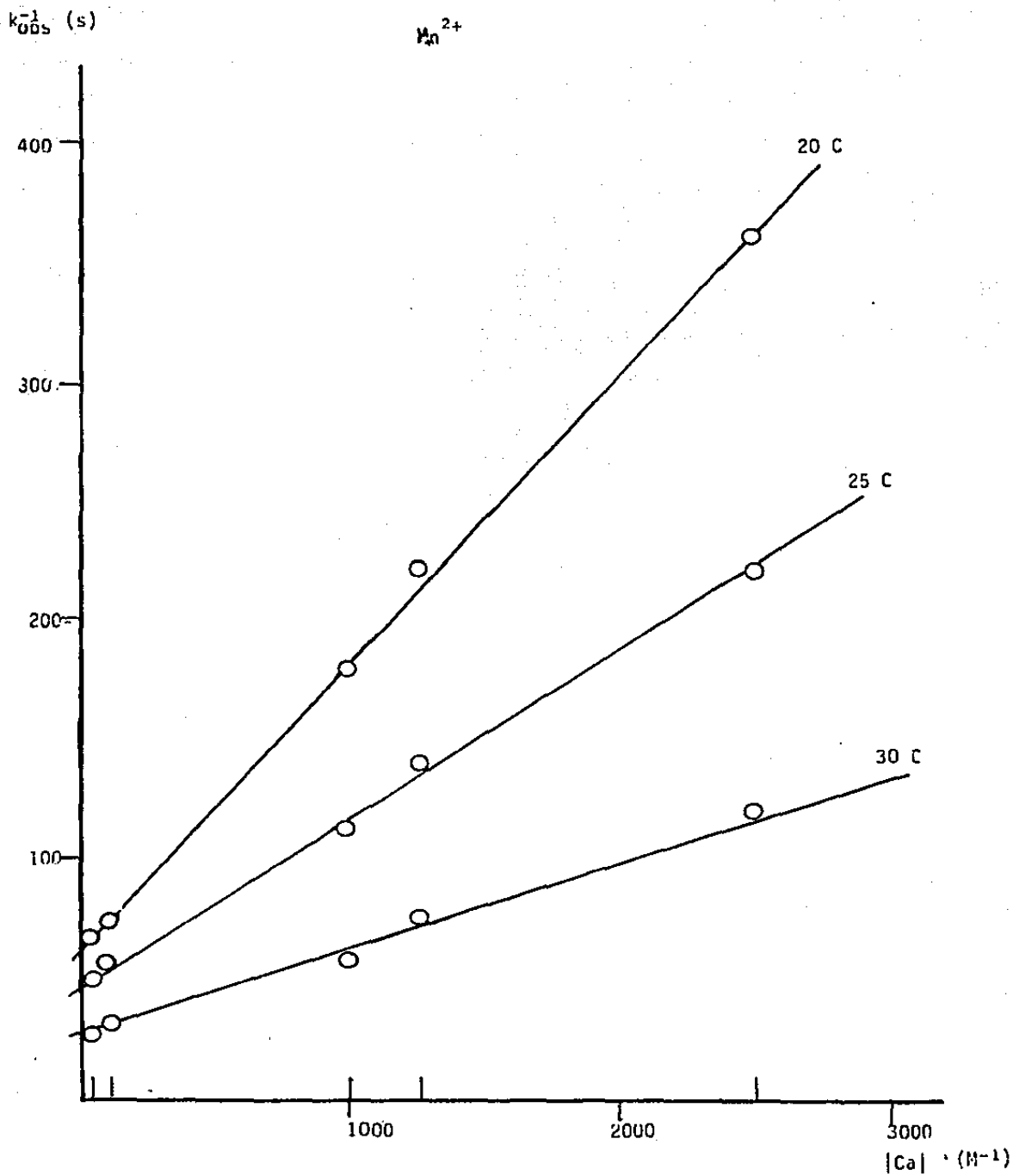


FIGURA 28

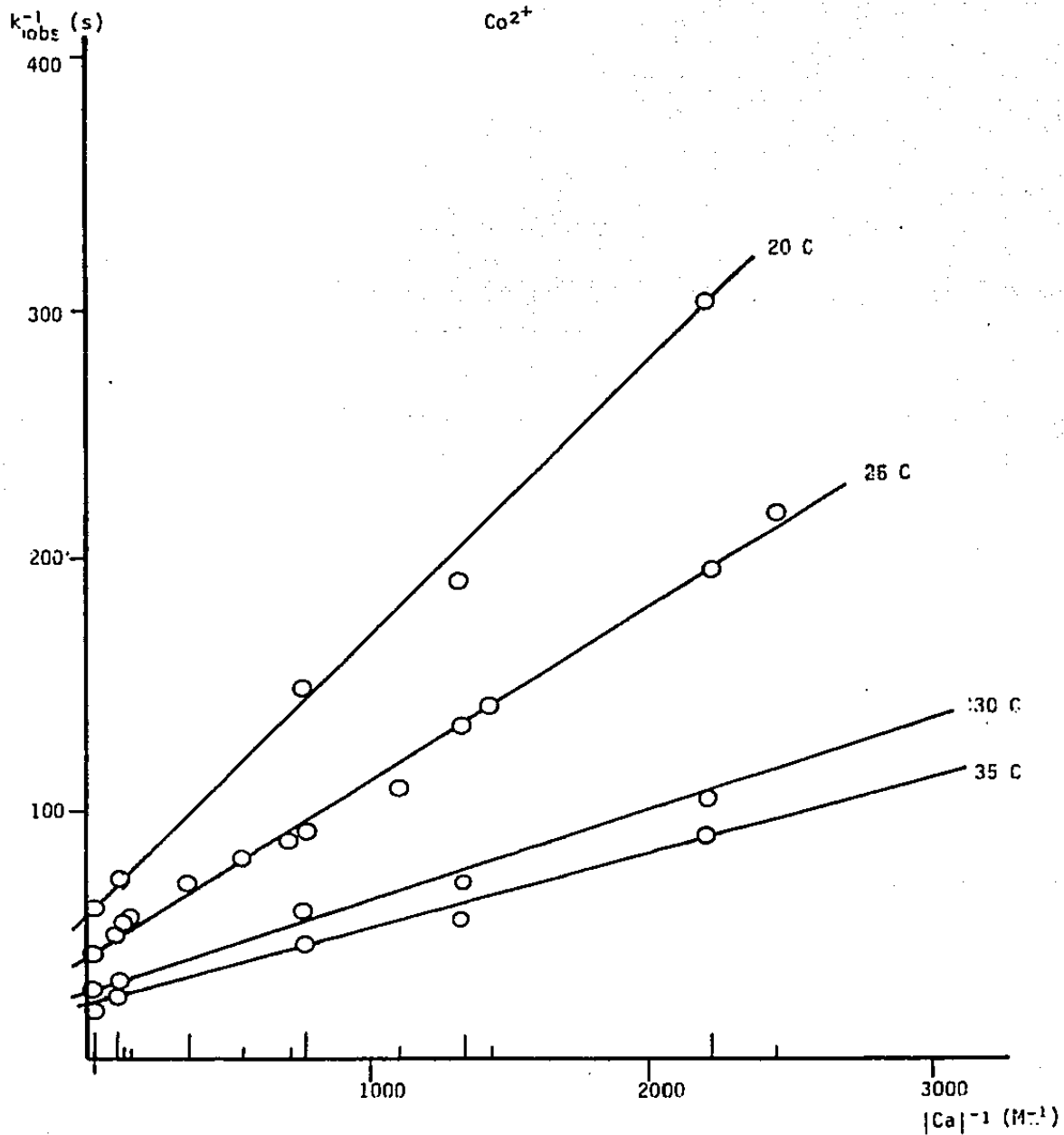
 Co^{2+} 

FIGURA 29

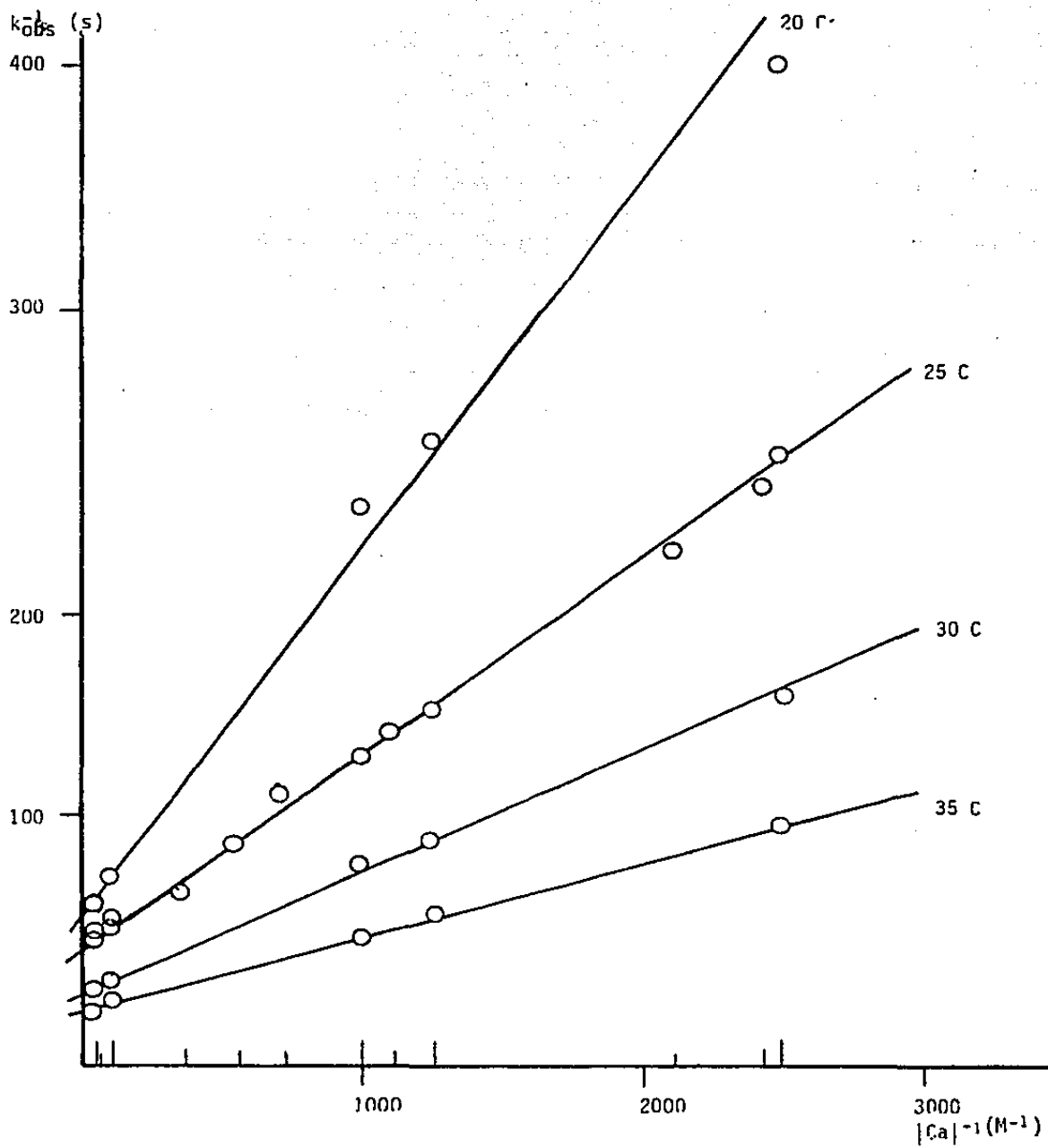
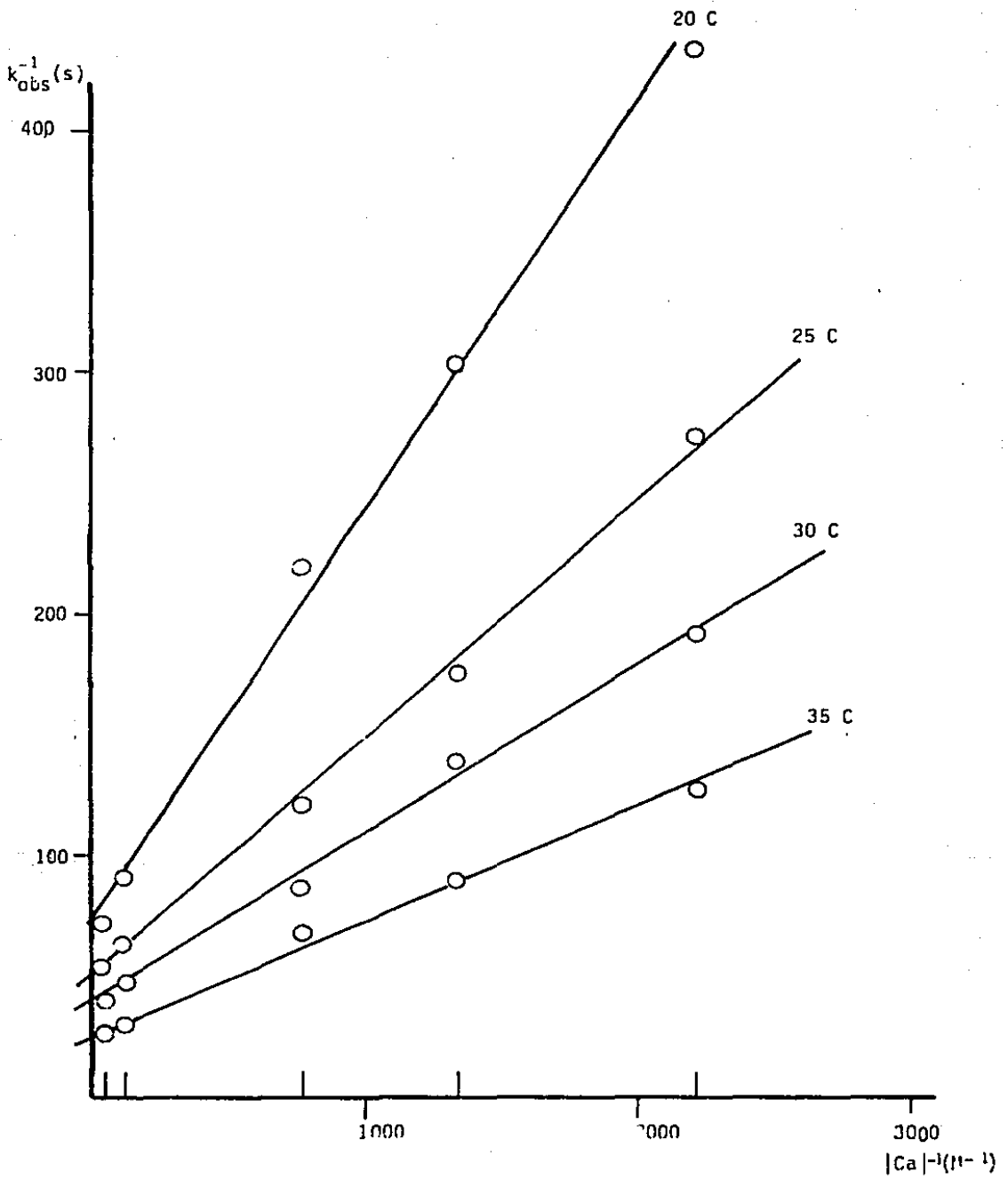
 Ni^{2+} 

FIGURA 30

 Zn^{2+} 

4) TRATAMIENTO DE LA CONSTANTE DE EQUILIBRIO

Si los valores obtenidos para la constante de equilibrio se analizan se puede ver que varían respecto a la temperatura. Así, se puede determinar entonces los parámetros termodinámicos que caracterizan la reacción.

En el caso de una constante de equilibrio se tendrá la siguiente relación:

$$-\frac{\Delta G^\circ}{RT} = -\ln K$$

por ello, si a la vez se considera:

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$$

entonces se puede obtener una relación lineal entre la constante de equilibrio del sistema en términos de estos parámetros, esto es:

$$\ln K_1 = -\frac{\Delta H_1^\circ}{RT} + \frac{\Delta S_1^\circ}{R}$$

de esta manera si se grafican los valores calculados de los datos obtenidos de K_1 , es decir, si se grafica $\ln K_1$ vs $1/T$, se esperará obtener una recta, cuya pendiente sea $-(\Delta H^\circ/RT)$ y su ordenada al origen sea $(\Delta S^\circ/R)$ esto es:

$$m = -\frac{\Delta H_1^\circ}{RT} \quad \text{y entonces} \quad \Delta H_1^\circ = -m R$$

y

$$\text{intcp.} = \frac{\Delta S_1^\circ}{R} \quad \text{y por tanto} \quad \Delta S_1^\circ = -\text{intcp.} \cdot R$$

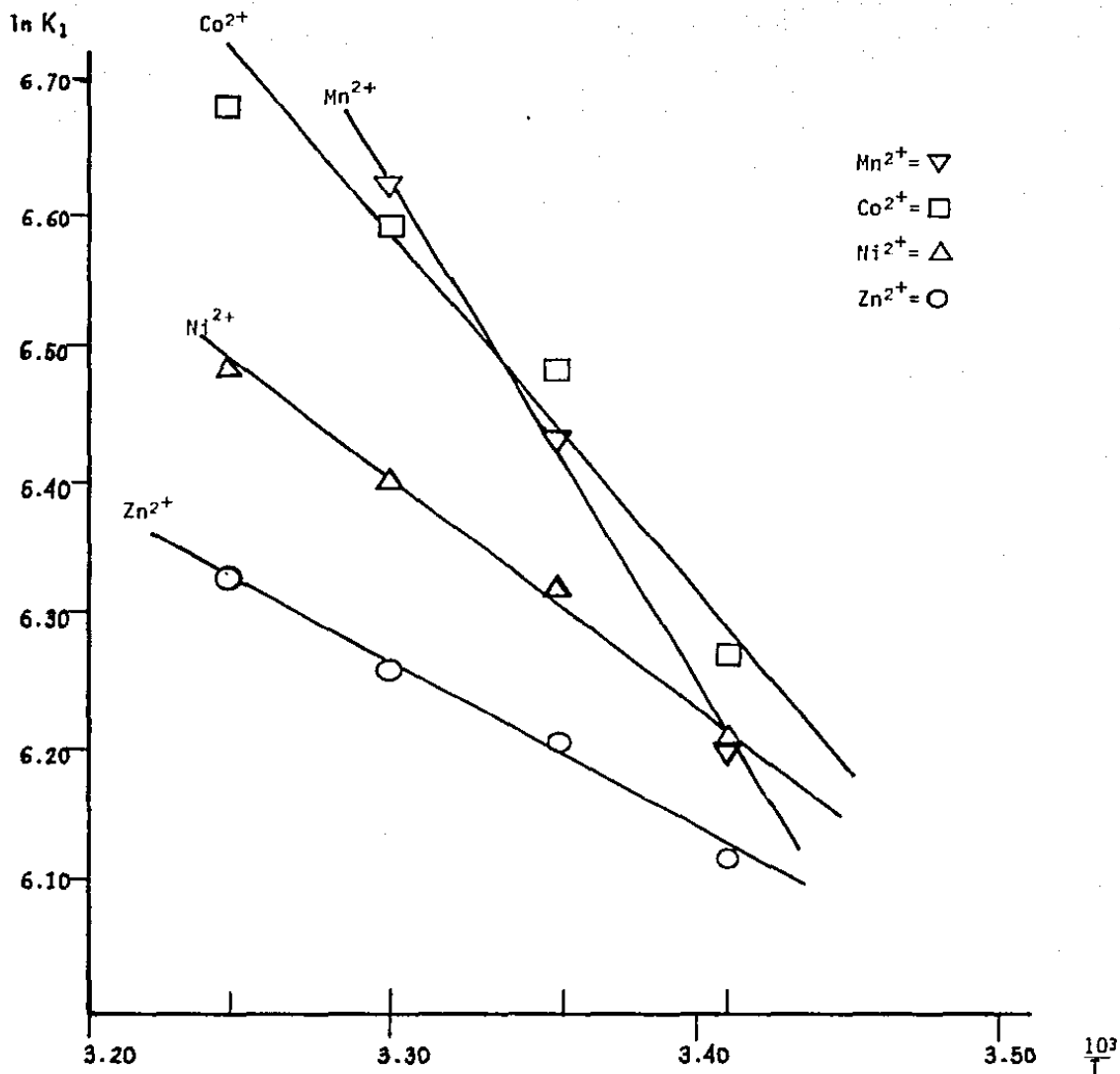
Por ello, al hacer una regresión de los valores de $\ln K_1$ y $1/T$ se pueden conocer cuáles son los valores de ΔH_1° y ΔS_1° para la reacción. En la tabla XIII se muestran los valores obtenidos de ΔS_1° y ΔH_1° para ca-

da uno de los metales empleados en los experimentos. A su vez en la figura 31 se muestran las gráficas de $\ln K_1$ vs $1/T$ (representados por las figuras geométricas en éstas) junto con las rectas teóricas obtenidas de la regresión.

TABLA XIII

METAL	ΔH_1° (Kcal M^{-1})	ΔS_1° (ue)	correlación
Mn^{2+}	7.34	37	-0.9960
Co^{2+}	4.98	29	-0.9929
Ni^{2+}	3.30	23	-0.9975
Zn^{2+}	2.43	20	-0.9951

FIGURA 31



5) ANALISIS DE LAS CONSTANTES DE VELOCIDAD

Si se considera la energía de activación de Arrhenius:

$$\frac{E_a}{RT^2} = \frac{d \ln k_2}{dT} \dots \dots \dots (13)$$

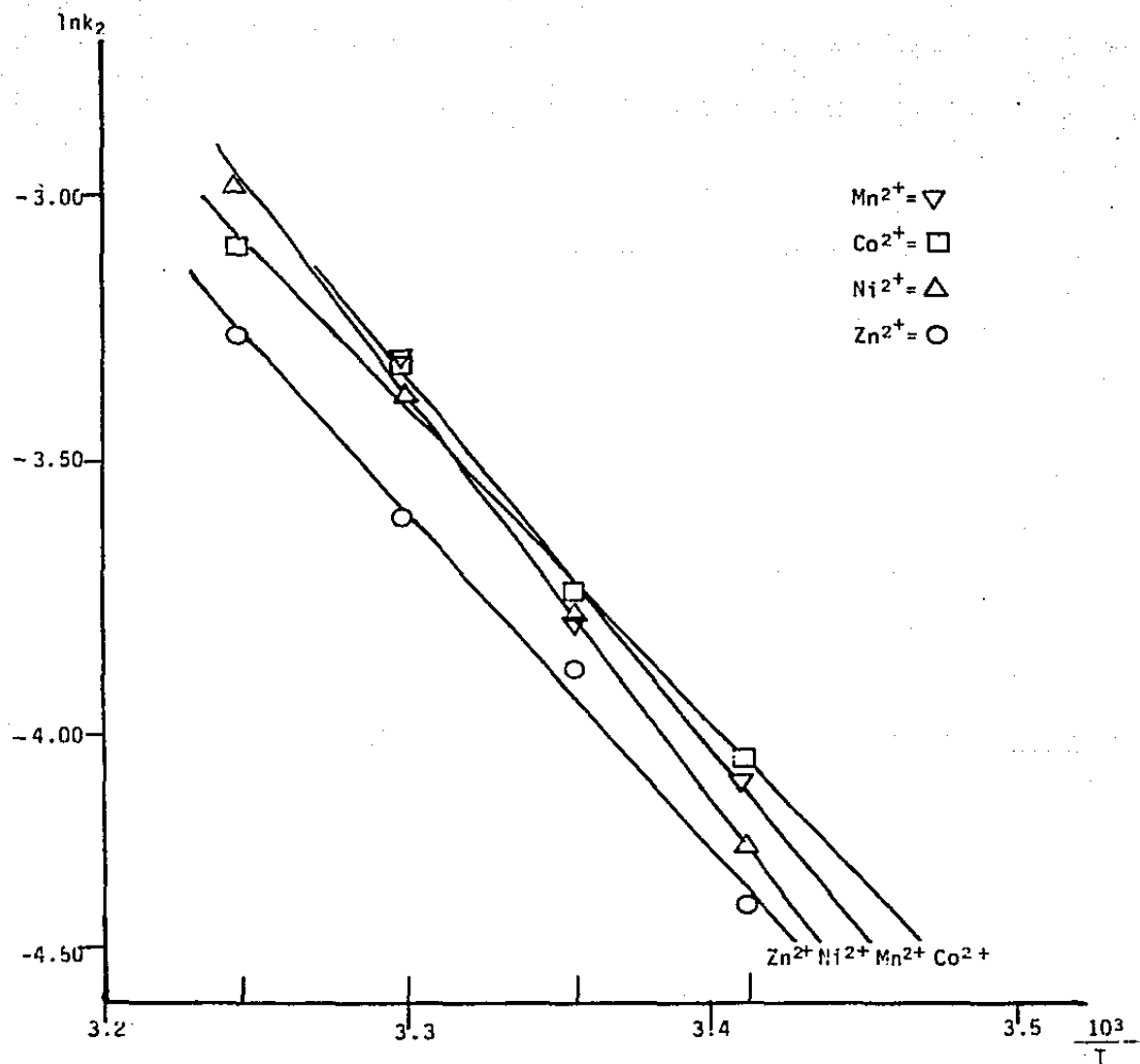
que en su forma integrada se puede expresar, como:

$$\ln k_2 = \frac{-E_a}{RT} + A \dots \dots \dots (14)$$

y a la vez se toma en cuenta que la mayoría de las reacciones elementales se ajustan a este comportamiento, siempre y cuando, en el intervalo de temperatura no se produzcan cambios que provocasen complicaciones en dicho proceso (desactivación de la proteína o desnaturalización de la misma). Entonces, es posible expresar el valor de esta energía de activación para la constante k_2 , pues se conoce cómo varía ésta con respecto a la temperatura. Esto es, si se grafica $\ln k_2$ vs $1/T$, se tendrá una línea recta cuya pendiente es $-E_a/R$, esta gráfica se muestra en la figura 32. Los valores obtenidos de E_a para cada uno de los metales usados se enlistan en la tabla XIV.

TABLA XIV			
Metal	E_a (Kcal M^{-1})	$\ln A$	Correlación
Mn ²⁺	13.7	19	-0.9906
Co ²⁺	11.8	16	-0.9923
Ni ²⁺	14.9	21	-0.9998
Zi ²⁺	12.3	16	-0.9971

FIGURA 32



Por otra parte, si se considera que la constante de velocidad de una reacción está dada según la teoría del estado de transición, por:

$$k_2 = \frac{kT K^\#}{h} \dots\dots\dots (15)$$

donde k es la constante de Boltzman, h es la constante de Plank, T es la temperatura y $K^\#$ es la constante de formación del complejo activado. Entonces dado que $K^\#$ se puede considerar como una constante de equilibrio normal será posible:

$$\Delta G^\# = - \ln K^\# \dots\dots\dots (16)$$

entonces:

$$k_2 = \frac{kT}{h} \exp (-\Delta G^\#/RT) \dots (17)$$

y dado que ΔG° puede expresarse:

$$\Delta G^\# = \Delta H^\# - T\Delta S^\# \dots\dots\dots(18)$$

entonces:

$$k_2 = \frac{kT}{h} \exp (-\Delta H^\#/RT) \exp (\Delta S^\#/RT) \dots(19)$$

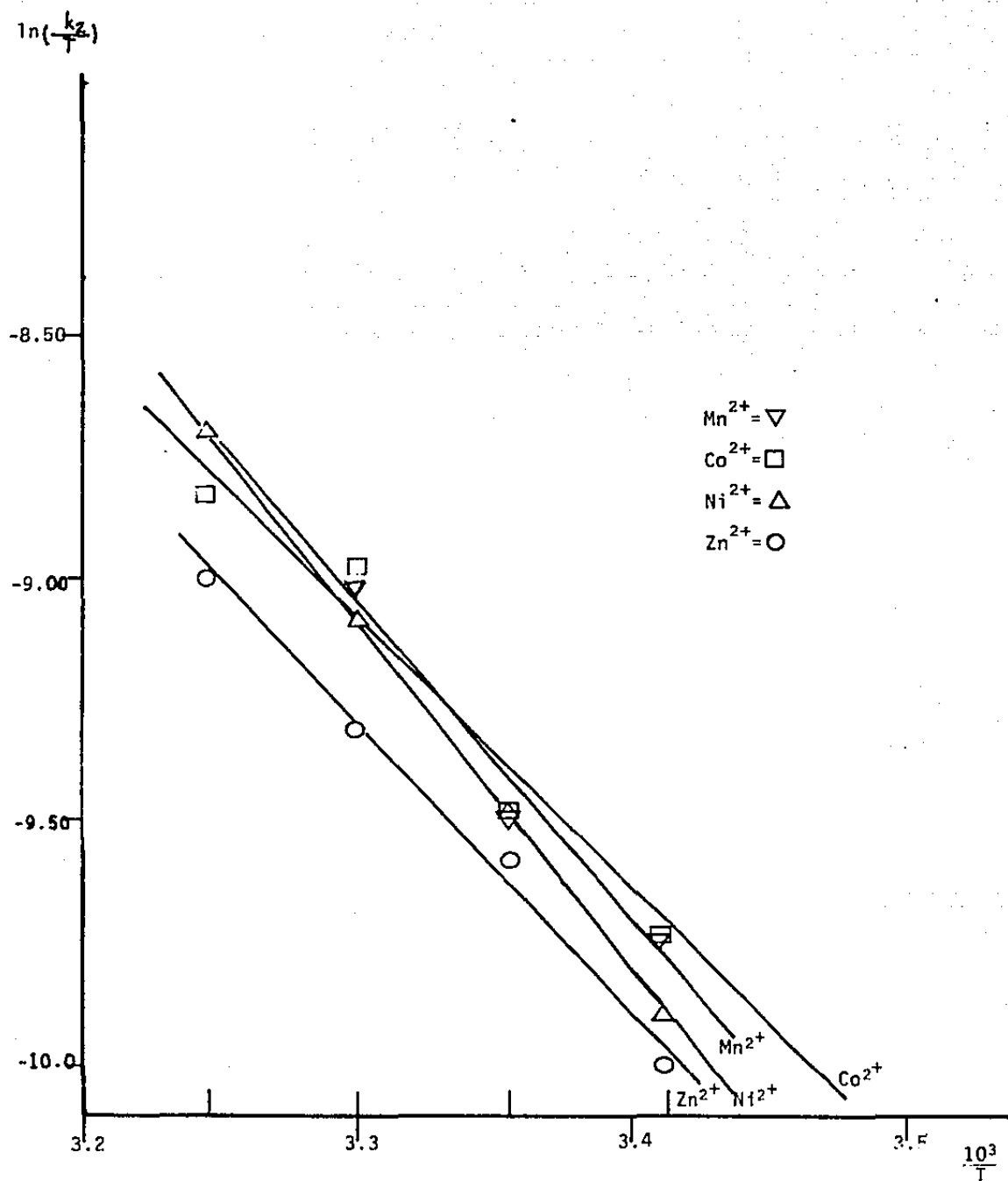
Ahora, si la ecuación (19) se divide por T se tiene que:

$$\frac{k_2}{T} = \exp(-\Delta H^\# / RT) \exp(\Delta S^\# / R) \text{ J/h} \dots\dots\dots(20)$$

si ahora se grafican los valores de $\ln(k_2/T)$ vs $1/T$ se obtendrá una línea recta cuya pendiente es $-\Delta H^\# / RT$. A continuación se muestran los valores de $\ln(k_2/T)$ y sus parejas correspondientes de inversos de la temperatura junto con los valores obtenidos de la pendiente y los cálculos de $\Delta H^\#$ correspondientes a cada uno de los metales. (Veáse tabla XV.) La figura 33 muestra a su vez la gráfica de los valores indicados junto con la línea recta determinada por medio de la regresión.

TABLA XV					
		Mn ²⁺	Co ²⁺	Ni ²⁺	Zn ²⁺
T°K	10 ³ /T	-ln(k ₂ /T)	-ln(k ₂ /T)	-ln(k ₂ /T)	-ln(k ₂ /T)
293	3.4129	9.7782	9.7314	9.9000	10.000
298	3.357	9.4913	9.4824	9.4824	9.5844
303	3.300	9.02967	8.9760	9.0805	9.3182
308	3.246	-----	8.831	8.7060	8.997
		Corr= -0.989	Corr= -0.980	Coor= -0.999	Corr= -0.996
		10 ⁻³ x m= -6.63	10 ⁻³ x m= -5.79	10 ⁻³ x m= -7.19	10 ⁻³ x m= -5.93
		ΔH ₂ [#] = 13.1	ΔH ₂ [#] = 11.5	ΔH ₂ [#] = 14.2	ΔH ₂ [#] = 11.7

FIGURA 33



Finalmente para conocer el valor de ΔS^\ddagger se debe considerar la expresión de ΔH^\ddagger en términos de la K de equilibrio para una reacción en solución "id est":

$$\Delta H^\ddagger = RT^2 \frac{d \ln K^\ddagger}{dT} - RT \dots\dots\dots (21)$$

y si se sustituye el valor de la constante de velocidad en esta expresión se tiene

$$\Delta H^\ddagger = RT^2 \frac{d \ln k}{dT} - RT \dots\dots\dots (22)$$

de aquí

$$\Delta H^\ddagger = E_a - RT$$

o bien $E_a = \Delta H^\ddagger + RT$

Si ahora se consideran las dos expresiones para la constante de velocidad (Arrhenius y del complejo activado) se tiene:

$$k_2 = A \exp (-E_a/RT) \dots\dots\dots (13)$$

y

$$k_2 = \frac{k \cdot T}{h} \exp (-\Delta S^\ddagger/R) \exp (-\Delta H^\ddagger/RT) \dots\dots\dots (19)$$

y debido a que

$$\exp (-E_a/RT) \approx \exp (-\Delta H^\ddagger/RT)$$

se puede considerar entonces que:

$$\frac{kT}{h} \exp (\Delta S^{\#}/R) = A$$

de aquí sacando logaritmo natural se tiene:

$$\ln \frac{kT}{h} + \frac{\Delta S^{\#}}{R} = \ln A$$

por lo tanto:

$$R (\ln A - 13.2) = \Delta S^{\#}$$

los valores obtenidos de $\ln A$ y calculados de $\Delta S^{\#}$ para cada uno de los iones metálicos probados se muestran en la tabla XVI

TABLA XVI		
Metal	$\ln A$	$\Delta S_2^{\#}$ (ue)
Mn ²⁺	19	11
Co ²⁺	16	5
Ni ²⁺	21	15
Zn ²⁺	16	5

6) CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir básicamente, lo siguiente:

I) El ión metálico de transición M^{2+} , tiene muy poca influencia en el valor de k_2 , la constante de primer orden que muestra el cambio conformacional de la proteína dimetalizada.

II) El enlace del Ca^{2+} a la proteína, que queda descrito por la constante de formación K_1 en este modelo, es débil y endotérmico, tampoco aparece estar muy influenciado por la naturaleza del ión de transición M^{2+} , aun cuando en este caso sí se puede observar una tendencia a presentar mayor estabilidad para los iones con menor número de electrones 'd', esto es: $Mn^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+}$.

III) La constancia de k_2 , demostrada previamente en otro trabajo en donde^{60} se detecta por medio de otro tipo de monitor el cambio conformacional, coincide razonablemente dentro de los límites del error experimental, con la tendencia observada en este trabajo.

IV) También, los valores obtenidos de la constante de la reacción entre la CoCon-A y el Ca^{2+} por medio del espectro de difracción circular en la región del ultravioleta^{70}, coinciden con los aquí reportados.

V) Finalmente, los valores reportados para ambas constantes K_1 y k_2 obtenidos en el trabajo de Brown y colaboradores por medio del espectro de RMN para la reacción entre la proteína con Mn^{2+} y el Ca^{2+} , coinciden también con los de este trabajo^{57}.

Por otra parte se tiene que aún cuando los parámetros termodinámicos para el paso reversible de la reacción, es decir, ΔH_1^\ddagger y ΔS_1^\ddagger son consistentes con los observados por otros investigadores^[57 60 70]; los valores de ΔH_2^\ddagger y de ΔS_2^\ddagger (que describen el cambio conformacional), no concuerdan con los que se reportan en este trabajo. Así cuando los valores reportados por otros investigadores para ΔH_2^\ddagger son del orden de 20 KcalM⁻¹ los que se reportan aquí son mucho menores (12 a 15 KcalM⁻¹). Consecuentemente los valores de ΔS_2^\ddagger reportados en este trabajo son mucho menores que los de otros investigadores. Ahora bien, aunque existe cierta evidencia que apoya los valores altos de ΔH_2^\ddagger , es decir, estos valores son consistentes con algunos datos que indican una isomerización "cis-trans" para el proceso del cambio conformacional reportados en un estudio hecho a la proteína nativa y la apo-proteína con técnicas de difracción de rayos-X^[31], este punto está en disputa hasta la fecha^[71]. Por ello los valores pequeños de energía de activación reportados, aún cuando producen cierta confusión, pueden tener validez, sobre todo si se toma en cuenta la gran cantidad de similitudes observadas en los otros parámetros medidos. Así, se puede considerar la necesidad de efectuar otro tipo de mediciones que pudiesen apoyar estos resultados. Ahora bien, debido que los cálculos de las constantes se efectúan por medio de los inversos de las constantes experimentales observadas y los inversos de las concentraciones de Ca²⁺, es posible que un error experimental en las medidas iniciales, se vea reflejado en los parámetros calculados. Sin embargo, tanto las tendencias observadas, como las similitudes con los valores reportados, permiten si bien no argumentar validez, tampoco desechar los

resultados.

Finalmente y resumiendo, es interesante el notar que la velocidad del cambio conformacional, el cual aparentemente resulta independiente de la naturaleza del ión que contenga la proteína, es importante también en casos de otras proteínas metálicas a juzgar por una serie de experimentos preliminares efectuados con otra proteína procedente de una planta (*banderica simplicifolia*) (72).

Bibliografía

- F. Basolo y R.G. Pearson; Mechanisms of Inorganic Reactions
J. Wiley and Sons Inc.: New York (1967)
- D. Benson; Mechanisms of inorganic reactions in solution, McGraw Hill:
New York (1968)
- JO'M. Bockris y Reddy AKN; Modern Electrochemistry VI. Plenum/Rosetta:
New York (1973)
- F.A.Cotton y G. Wilkinson; Advanced Inorganic Chemistry. J. Wiley &
Sons: New York (1980)
- L.W.Forney; Chemical Principles for Life; Prentice Hall: New Jersey
(1978)
- M.N.Hugues; The Inorganic Chemistry of Biological processes, J. Wiley
& Sons: London (1972)
- F.R.Hartley et al.; Solution Equilibria. Ellis Horwood: Chichester
(1980)
- K.Hiromi; Fast Enzyme Reactions, J. Wiley & Sons: Tokio (1980)
- Ei-Ichiro Ochiai; Bioinorganic Chemistry: An Introduction. Allyn &
Bacon Inc.: Boston (1977)
- W.B. Jensen; The Lewis acid-base Concepts: an overview. J. Wiley & -
Sons: New York (1980)

A.L.Lenninger; Bioenergética, Fondo educativo interamericano; México (1975)

H.R.Mahler y E.H.Cordes; Biological Chemistry, Harper & Row: New York (1966)

H.Rossotti; The study of ionic Equilibria, Longman: London (1978)

G.Schwarzenbach y H.Flashka; Complexometric titrations, Methuen & Co. London (1969)

R.G.Wilkins; The study of Kinetics and mechanism of Inorganic reactions of transition metal complexes; Allyn & Bacon Inc.: Boston (1974)

J.R.Whitaker; Principles of enzymology for the food Sciences; Marcel Dekker Co; New York (1972)

REFERENCIAS

- { 1 } a) Ei-Ichiro Ohtai; *Bioinorganic Chemistry: an introduction*. Allyn & Bacon Inc.; Boston (1977). b) *J. Chem. Ed.* 51, 235 (1974)
- { 2 } M.N.Hughes; *The Inorganic Chemistry of Biological Processes*. John Wiley & Sons: London (1972)
- { 3 } D.D.Ulmer y B.L.Vallee; *Structure and Function of Metalloenzymes*. en: A.C.S. Adv.in Chem.Ser. 100, p187, ACS pub.; WashingtonD.C. (1971)
- { 4 } R.J.P.Williams; *Biochemistry of groups IA and IIa cations*. *ibid.* p 155.
- { 5 } D.I.Bush et al.; *Chemical Foundations for Understanding of natural macrocyclic compounds*. *ibid.* p44
- { 6 } G.L.Eichorn et al.; *The Effect of metal ions on the Structure of Nucleic Acids*. *ibid.* p135.
- { 7 } G.N.Schrauzer; *Model Studies in Nitrogen Fixation and Cobalamine Chemistry*; *ibid.* p1
- { 8 } D.R.Eaton; *Structure of 2nd Coordination Sphere of Metal Complexes and its Role in Catalysis*. *ibid.* p174
- { 9 } F.Basolo y R.G.Pearson; *Mechanisms of Inorganic Reactions*; J.Wiley & Sons Inc.; New York (1967)
- { 10 } J.R.Whitaker; *Principles of Enzymology for the Food Sciences*. Marcel Dekker Inc.; New York (1972).

- {11} H.R.Malher y E.H.Cordes; *Biological Chemistry*, Harper & Row; New York, (1966)
- {12} L.W.Forney; *Chemical Principles for Life*, Prentice Hall: New Jersey (1978)
- {13} H.Rossotti; *The study of Ionic Equilibria*. Longman: London (1978)
- {14} F.A.Cotton y G.Wilkinson; *Advanced Inorganic Chemistry*. John Wiley & Sons: New York (1980)
- {15} F.R.Hartley, C.Burgess y R.Alcock; *Solution Equilibria*. Ellis Horwood: Chichester (1980)
- {16} H.Irving y R.J.P.Williams; *J.Chem.Soc.*; 3192 (1953)
- {17} G.Schwarzenbach; *Adv.Inorganic Chem.Radiochem.*, 3, 257 (1961)
- {18} J.O.Edwards y R.G.Pearson; *J.Am.Chem.Soc.*; 84, 16 (1962)
- {19} R.G.Pearson; *J.Am.Chem.Soc.*; 85, 3533, (1963)
- {20} R.G.Pearson; *Chem.Britt.*, 3, 103 (1963)
- {21} W.B.Jensen; *The Lewis Acid-Base Concepts- an overview*. J.Wiley & Sons; New York (1980).
- {22} N.Sharon y H.Lis; *Science*; 177, 949, 825 (1952)
- {23} a) J.B.Sumner y S.F.Howell; *J.Bacteriol*, 32, 538 (1936). b) J.B. Sumner; *J.Biol.Chem*, 37, 137 (1919).
- {24} W.C.Boyd; *Ann.Acad.Sci.U.S.A.*, 169, 168 (1950)
- {25} W.M.Watkins, W.T.J.Morgan; *Nature*, 169, 825 (1952)
- {26} J.C.Aub et al.; *Proc.Natl.Acad.of Sci.U.S.A.*, 50, 613 (1963)
- {27} J.L.Wang et al.; *ibid.*, 68, 1130 (1971)
- {28} A.Kalb y A.Lustig.; *Biochim. et Biophys.Acta*, 168, 366 (1968)
- {30} M.Shoham et al.; *F.E.B.S.Letters*; 95, 54 (1978)

- {31} G.N.Reeke Jr. et al.; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*; 75, 2286 (1978)
- {32} G.R.Gunther et al.; *ibid.*; 70, 1012 (1973)
- {33} I.J.Goldstein et al. *Arch.Biochem.Biophys.*; 127, 787, (1968)
- {34} I.J.Goldstein et al. *ibid.*; 111, 407 (1965)
- {35} N.Young; *ibid.*; 336, 46 (1974)
- {36} L.L.So y I.J.Goldstein; *J.Biol.Chem.*; 243, 2003 (1968)
- {37} G.F.Springer et al.; *Biochemistry*; 3, 1076 (1964)
- {38} F.G.Loontjens et al.; *Carbohidr.Res.*; 30, 51 (1973)
- {39} F.G.Loontjens et al.; *Biochemistry*; 16, 159 (1977)
- {40} F.G.Loontjens et al.; *ibid.*; 16, 167 (1977)
- {41} R.G.Wilkins; *The Study of Kinetics and Mechanisms of Reactions of Transition Metal Complexes*; Allyn & Bacon Inc.: Boston (1974)
- {42} K.Hiromi; *Fast Enzyme Reactions*; John Wiley & Sons: Tokio (1980)
- {43} D.Benson; *Mechanisms of Inorganic Reactions in Solution*, Mc Graw Hill; New York (1968)
- {44} K.Kustin; *Methods in Enzymology Ch V*; Academic Press; New York (1969)
- {45} B.Gordon y A.C.Wall; *J,Am.Chem.Soc.*; 80, 273 (1978)
- {46} H.Gutfreund; *Methods in Enzymology Ch VII*; Academic Press: New York (1969).
- {47} H.Q.Gibson; *ibid.* Ch.VI.
- {48} H.Q.Gibson y L.Milnes; *Biochem.J.*; 91, 161 (1964)
- {49} J.I.Morrow; *Chem.Instr.*; 2, 375 (1970)
- {50} C.Nicolau et al.; *Biochem.Biophys.Acta*; 194, 71 (1969)
- {51} W.D.Mc Cubbin et al.; *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 43, 666 (1971)
- {52} G.Gachelin et al.; *Eur.J.Biochem.*; 30, 155 (1972)

- {53} R.H.Glew et al.; *F.E.B.S.Letters*; 52, 185 (1975)
- {54} A.D.Sherry y G.L.Cottam; *Arch.Biochem. and Biophys.*, 156, 665 (1973)
- {55} J.J.Grimaldi y B.D.Sykes; *J.Biol.Chem.* 256, 1618 (1975)
- {56} C.E.Richardson y W.D.Bennke; *J.Mol.Biol.* 102, 441 (1976)
- {57} R.D.Brown III et al.; *Biochemistry*; 16, 3883 (1977)
- {58} M.Shoham et al.; *F.E.B.S.Letters*, 95, 54 (1978)
- {59} G.N.Reeke et al.; *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 75, 2286 (1978)
- {60} A.D.Sherry et al.; *Biochemistry*, 17, 2167 (1978)
- {61} P.C.Harrington y R.G.Wilkins; *Biochemistry*, 17, 4245 (1978)
- {62} J.O'M.Bockris y A.K.N.Reddy; *Modern Electrochemistry V.I.* Plenum/Rosetta; New York (1973)
- {63} G.Schwarzenbach y H. Flashka; *Complexometric Titrations*, Methuen & Co.; London (1969)
- {65} J.O.Edwards y E.F.Greene; *J.Chem.Ed.*, 45, 381 (1968)
- {66} J.Halpern; *J.Chem.Ed.*, 45, 373 (1968)
- {67} R.Baker et al.; *Inorganic Chemistry*, 6, 1948 (1967)
- {68} G.Dulz y N.Sutin; *J.Am.Chem.Soc.*, 86, 829 (1964)
- {69} H.N.Halverston y J.Halpern; *ibid.*, 78, 5562 (1956)
- {70} D.Cardin et al.; *J.Biol.Chem.*, 254, 8877 (1979)
- {71} M.Shoham et al.; *J.Mol.Biol.*, 131, 137 (1979)
- {72} P.C.Harrington, R.Moreno y R.G.Wilkins; *Israel J. of Chemistry*; en prensa, (1980)