



Aspectos actuales de la investigación en Bioquímica

POR

JOSE A. LOZANO TERUEL

I.—EL MECANISMO DE LA FOSFORILACION (*)

La Bioquímica es una Ciencia reciente; por otra parte su material de estudio, la materia viva, y su finalidad como ciencia, el describir en términos físicos y químicos los procesos vivientes, son muy complejos. Junto a logros espectaculares como la dilucidación de las principales vías metabólicas, el hallazgo del sentido fisiológico de muchos resultados obtenidos en experimentaciones "in vitro", el conocimiento íntimo del papel de los ácidos nucleicos, la consecución de la síntesis enzimática de DNA activo biológicamente, etc., existen otras parcelas básicas que aun están sometidas a un alto grado de especulación.

Un ejemplo típico lo encontramos al profundizar en los procesos de fosforilación, mecanismo mediante el cual los seres vivos utilizan la energía liberada en los procesos exergónicos tales como los catabólicos y crean a partir del ADP (adenosindifosfato) y de Pi (fosfato) moléculas de ATP (adenosintrifosfato), con un enlace de una alta energía de hidrólisis (—) que sirve de almacén de energía utilizable posteriormente en los procesos físicoquímicos que requieren un aporte energético para que tengan lugar.

(*) Tema presentado en la II Reunión de Química Orgánica y Bioquímica. Monasterio de Piedra, abril 1968.



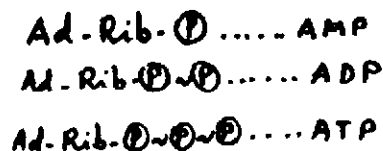
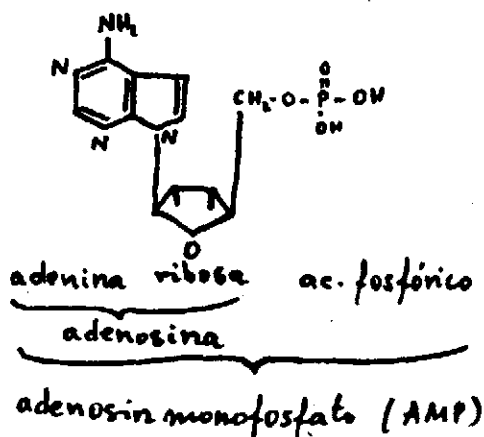


figura 1

La finalidad de este artículo es exponer concisamente cuál es la situación actual en este campo, deteniéndonos a considerar junto a la teoría "clásica" de la fosforilación, como podemos denominar a la química, otras aportaciones modernas como la quimiosmótica y la conformacional, que aun cuando aparentemente parten de bases muy distantes, los resultados más recientes parecen indicar que en el fondo podrían tener bastantes puntos en común.

INTRODUCCION

Podemos suponer para simplificar que el cambio de energía libre en la hidrólisis del ATP es del orden de -8 Kcal/mol: $\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{Pi}$, $\Delta G^{\circ} \approx -8$ Kcal/mol. Si en un proceso bioquímico, en una etapa existe un cambio de energía libre lo suficientemente negativo para que sea menos de -8 Kcal/mol, esta energía se puede aprovechar, almacenándola, si se utiliza para formar una molécula de ATP a partir de ADP y Pi. Así sucede en los procesos biológicos exergónicos tales como la oxidación de azúcares, proteínas o grasas. La energía, almacenada en forma de ATP se puede liberar nuevamente en el momento más conveniente y aprovechase más o menos directamente:

—Para formar otras sustancias con enlaces de alta energía de hidrólisis (fosfato de creatina, etc.).

—Como energía metabólica en procesos biosintéticos, en los que por lo general existe un cambio de entropía muy negativo, por lo cual para que tengan lugar se ha de suministrar energía al sistema.

—Para convertirse en energía mecánica, por ejemplo, contracción muscular.

—Para convertirse en trabajo eléctrico en procesos nerviosos.

—Para convertirse en trabajo osmótico, en la acumulación de iones contra un gradiente de concentración.

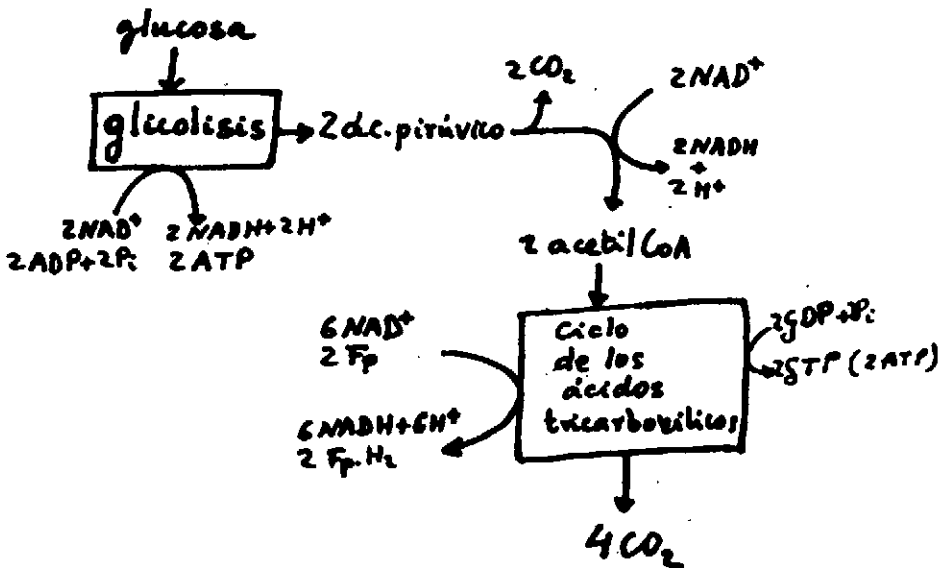
—Para convertirse en energía luminosa a través de la bioluminiscencia.

Para concretar el modo de almacenar energía en forma de ATP, vamos a referirnos al ejemplo de la degradación de la glucosa hasta CO_2 y H_2O , que se puede expresar de un modo químico como una combustión:



Desde Lavoisier se conoce la estrecha relación entre la combustión y la respiración (“una combustión suave”), por lo cual esa misma reacción química nos sirve para expresar globalmente el proceso de la respiración de la glucosa por un organismo vivo.

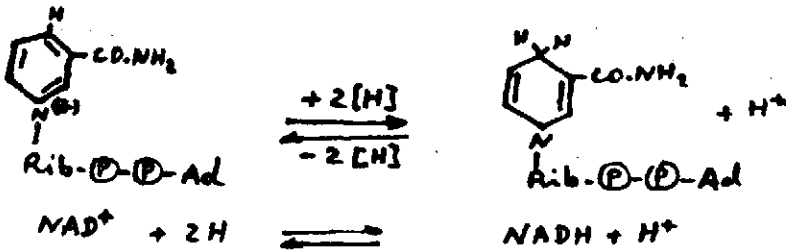
Fig. 2



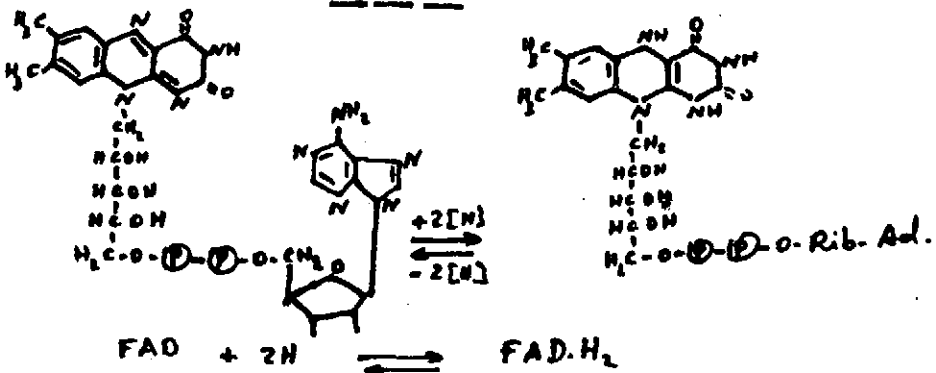
Degradación de la glucosa

En la figura 2 comprobamos que en las distintas etapas biológicas que nos conducen a la degradación hasta CO_2 , se producen 4 moles de ATP directamente. Por otra parte, por molécula de glucosa, se reducen 10 moléculas de NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleótido) hasta NADH y otras dos moléculas de flavoproteínas pasan también a la forma reducida con reacciones redox como se expresa en la figura 3.

Figura 3



*nicotinamida adenin dinucleotido
formas oxidada y reducida*

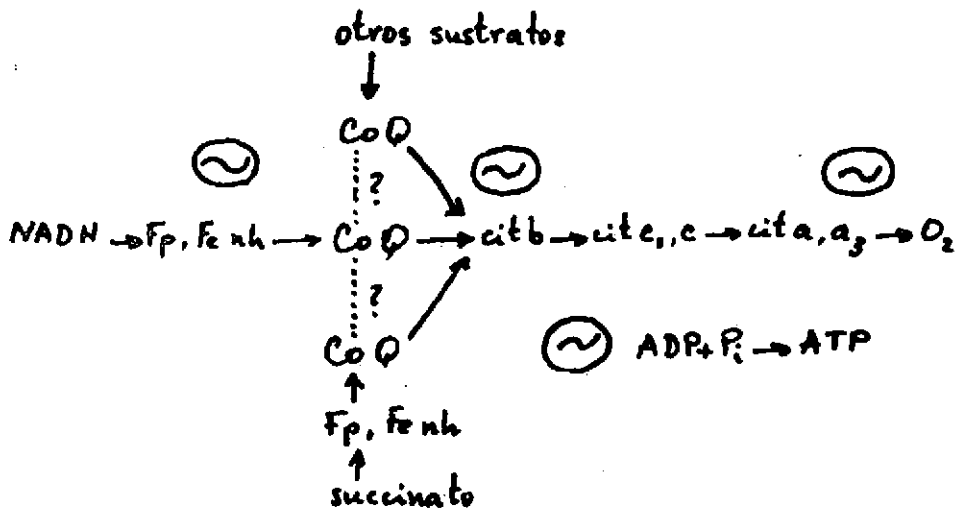


flavina adenin nucleotido; formas oxidada y reducida

Estas moléculas reducidas se reoxidan por el oxígeno molecular a través de una cadena de transporte de electrones, como se observa en la figura 4. La diferencia de potenciales redox entre el sistema NADH/NAD^+ y el sistema $\frac{1}{2}\text{O}_2/\text{O}^-$ es de: $-0,32-0,81 = -1,13$ voltios que equivalen a un cambio de energía libre $\Delta G^0 = -nF\Delta E = -2,23 \times 1,13 = -52$ kcal/mol, más que suficiente para conseguir los tres ATP por cada NADH (teóricamente bastaría con 24 kcal/mol). Razonamiento análogo es tam-

bién válido para la obtención de dos moléculas de ATP por la oxidación de una de flavoproteína.

Figura 4. Cadena respiratoria



En total por cada molécula de glucosa exigida hemos obtenido:

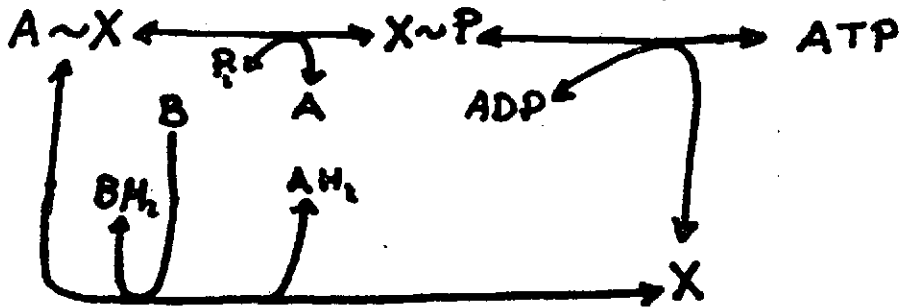
4 ATP directamente.

10.3 = 30 ATP procedente de la reoxidación de los 10 NADH.

2.2 = 4 ATP procedente de la reoxidación de las 2 flavoproteínas.

Ello hace una suma de 38 ATP, que suponiendo proporcionarán una energía de hidrólisis de 8 kcal./mol nos proporcionarán 304 kcal, que comparadas con las 680 kcal, teóricas nos proporcionan un rendimiento del 44% para el proceso global.

Como vemos, la mayor parte de los 38 ATP se obtienen mediante la fosforilación acoplada a la cadena de transporte de electrones hasta oxígeno, o sea mediante la fosforilación oxidativa. Por ello no es extraño el interés de estudiar el mecanismo de esta fosforilación oxidativa cuya existencia se conoce en mitocondrias animales desde 1948 (Lehninger, Kennedy) y en mitocondrias de plantas desde 1951.



Hipótesis química de formación del ATP

Figura 5

TEORIA QUIMICA DE LA FORMACION DEL ATP

Según esta teoría, la más extendida, la formación del ATP se realiza aprovechando la energía de una reacción redox tal como: $AH_2 + B + ADP + P_i \rightleftharpoons A + BH_2 + ATP$, que propuso Slater en 1953, conservándose la energía de oxidoreducción en forma de compuestos ricos en energía de hidrólisis, tal como se expresa en la figura 5, que representa uno de los varios esquemas propuestos. Realmente cabe la posibilidad de más de un mecanismo, hasta de uno distinto para cada lugar de fosforilación en la cadena de transporte de electrones; sin embargo, la acción de desacopladores como el 2,4 dinitrofenol (DNP) y de inhibidores tales como la oligomicina, parece lo bastante general en todos los lugares, para que se piense en la existencia de un solo esquema, como el propuesto.

Una sustancia se dice desacopladora cuando al actuar sobre un preparado mitocondrial con capacidad fosforilante, elimina ésta, pero sigue realizándose el proceso de respiración. Si también actúa eliminando la respiración, la definimos como un inhibidor.

Entre las ventajas de un esquema como el propuesto, podemos citar:

1.—El transporte de electrones, o sea los procesos redox de la cadena respiratoria se realiza según la parte inferior del esquema mientras el aco-

plamiento energético se efectúa según la parte superior del esquema, a través de intermedios de alta energía de hidrólisis (\sim) fosforilados o no. La hidrólisis de alguno de estos intermedios consigue que no funcione bien la parte superior del esquema o sea que no se produzca fosforilación, lo cual no es obstáculo para que se pueda seguir realizando el transporte de electrones. Así sucede en algunas preparaciones de mitocondrias o submitocondriales. El mismo efecto produce la presencia de desacopladores tales como el DNP, al actuar sobre preparaciones fosforilante, consiguiendo desacoplarlas pero sin impedir e incluso estimulando el transporte de electrones. En relación con este extremo se ha señalado que el DNP hidroliza compuestos del tipo $A \sim X$, lo cual desde luego teóricamente produciría los efectos comprobados en la práctica.

Los inhibidores lo que impiden es una etapa del proceso global. Así la oligomicina parece actuar inhibiendo la etapa de formación de ATP a partir de ADP y $X \sim P$, por lo cual al acumularse $X \sim P$, se termina por detener el proceso total. Si además de la oligomicina se añade DNP, lo lógico sería esperar la existencia de respiración y la ausencia de fosforilación, como ocurre en realidad.

2.—El esquema está de acuerdo con el hecho de que al adicionar ADP se produce un estímulo en la respiración pero que en ausencia de un aceptor del fosfato del ATP, al acumularse éste (ley de acción de masas) se inhibe la respiración.

3.—Respecto al problema de los intermedios de alta energía de hidrólisis, de acuerdo con el esquema debe existir alguna participación directa de los catalizadores respiratorios en la formación de intermedios de alta energía. Chance y colaboradores en 1966, en mitocondrias y partículas submitocondriales fosforilantes, han demostrado la existencia de un pigmento hasta entonces no detectado con una banda α a $555 m\mu$ a la temperatura del nitrógeno líquido. Parece situado entre citocromo b y citocromo c y se ha identificado tentativamente como un $cit\ b_{555}$ de alta energía, que *depende del estado energético de la mitocondria*.

Según Ernster en su revisión sobre oxidaciones biológicas (Ann. Rev. Bioch. 1964) las mitocondrias desacopladas respecto a fosforilación pueden seguir estando acopladas respecto a la formación de intermedios de alta energía, lo cual significa, en términos del esquema, que éste funcionará parcialmente y se acumularán compuestos de alta energía de hidrólisis.

En la actualidad se estudian, intentando detectarlos, esos tipos de intermedios, lo que supone en muchos casos un problema delicado de técnicas instrumentales. Tomando por base la existencia de estos intermedios,

se han propuesto diversos mecanismos entre los que citaremos aquellos en los que intervienen los intermedios cuya existencia es más probable:

a) Aciltioesteres, pues los reactivos de restos tioles son desacopladores que parecen tener la misma acción aparente que el DNP, o sea que actuarían sobre complejos del tipo $A - X$ del esquema. Falcone propuso en 1966 un esquema de este tipo.

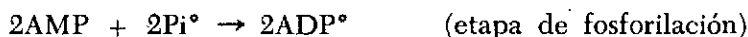
b) Derivados, de alta energía de hidrólisis, de NAD^+ o $NADH$. Se han descrito bastantes, fosforilados o no, con sus correspondientes esquemas de funcionamiento. Destaca el estudio de D. E. Griffiths (1963-6) de un derivado fosforilado que se forma como consecuencia de la incubación de NAD^+ y P_i con mitocondrias de corazón, en presencia de succinato y en ausencia de adeninnucleotido que puede actuar como aceptor de fosfato. El compuesto, purificado, demostró capacidad para transferir fosfato hasta ADP, en una reacción catalizada por partículas submitocondriales y que es sensible a la oligomicina.

c) Compuestos del tipo proteínas-fosfato. Así, en 1963 Boyer señaló como intermedio de la fosforilación oxidativa a una fosfohistidina de una proteína de mitocondrias. Posteriormente rectificó en el sentido de que la asociación real era con succinil tioquinasa en una fosforilación a nivel de sustrato. De cualquier forma, al menos se han descrito 5 tipos diferentes de enlaces fosfatos con proteínas mitocondriales diferenciales por su labilidad frente a ácido y bases. De todos modos falta la demostración de su relación con la fosforilación oxidativa.

d) Otro tanto sucede en relación con los derivados quinónicos y aunque hay un acuerdo general de que los fosfatos quinólicos pueden ser intermedios en la fosforilación oxidativa, al formarse pirofosfatos, sin embargo permanece en la oscuridad el proceso de formación del fosfato quinólico a partir de una quinona, aunque existen explicaciones menos o más convincentes.

OTRAS HIPOTESIS QUIMICAS

Ozawa y colaboradores (1965) llegan a la conclusión tras sus experiencias sobre mitocondrias de corazón de buey, de que el ADP no es el aceptor de los grupos fosfatos, sino que es el AMP. Después de una revisión crítica de las experiencias originales, sobre todo en relación con los procedimientos experimentales, sus datos más recientes (1966) les llevan a postular el siguiente proceso de fosforilación:



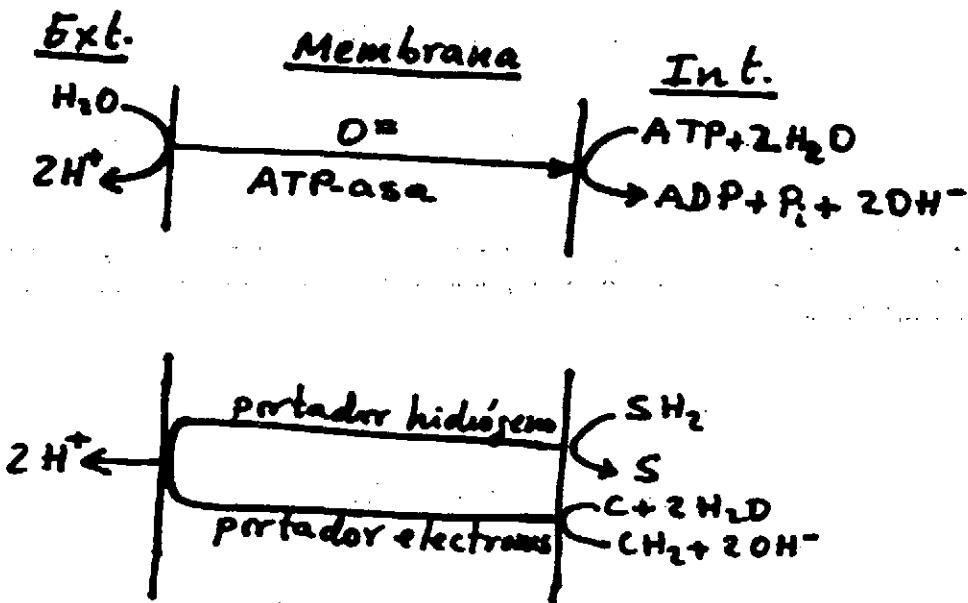
Por otra parte, los trabajos más recientes de Pullman y Colli, han fallado al intentar confirmar estas experiencias con mitocondrias de hígado de rata, concluyendo por el contrario que es el ADP el que actúa como aceptor del fosfato.

LA HIPOTESIS QUIMIOSMOTICA

Fue expuesta por primera vez por Mitchell en Nature en 1961 y su desarrollo en la forma actual se ha realizado principalmente en 1966 y 1967. Según tales ideas el acontecimiento primario para el proceso de acoplamiento no es la formación de intermedios de alta energía, sino la translocación de protones a través de la membrana de acoplamiento, debido a la respiración. Al ser esta membrana relativamente impermeable a los iones en general, ocasiona no sólo un gradiente de concentración de protones (potencial químico) sino también un gradiente eléctrico (potencial de membrana).

Lo fundamental para esta hipótesis es que la síntesis del ATP se deba simplemente a la reversión de la reacción catalizada por una ATP-asa (hidrólisis del ATP en ADP y P_i). Esta reacción ATP-ásica está asociada a las membranas mitocondriales y tendría lugar según la figura 6.

Como la energía libre tipo de hidrólisis del ATP es del orden de -8cal/mol , el equilibrio en condiciones tipo, estará muy desplazado en el sentido de la hidrólisis. Ahora bien, si mediante algún mecanismo suministramos iones hidroxilo en el interior de la membrana y protones en el exterior, la reacción tendría lugar al revés. Este "sometimiento" a los protones e hidróxilos separados por una membrana es precisamente el efecto producido por la cadena respiratoria, sobre todo en los tramos en los que se acopla una reacción redox entre un portador de hidrógeno del tipo AH_2 con un portador de electrones del tipo B^{+3} , según la reacción: $\text{AH}_2 + 2\text{B}^{+3} \rightleftharpoons \text{A} + 2\text{B}^{+2} + 2\text{H}^+$, que de un modo gráfico se expone en la figura.



Hipótesis de Mitchell de la fosforilación Figura 6

Según la hipótesis quimiosmótica, la cadena de transporte de electrones se representaría con el citocromo b antes del coenzima Q, con los tres lugares de fosforilación indicados en la figura 7, correspondiendo a cada uno de ellos un esquema operacional como el indicado antes. En resumen, el proceso de formación del ATP por la reversión de la reacción catalizada por la ATP-asa sería la expuesta en la figura 8.

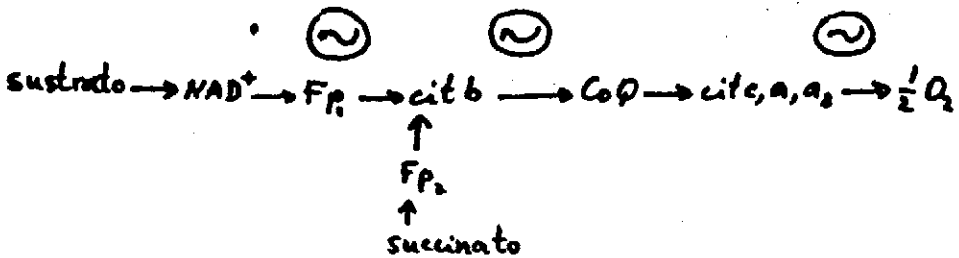
Son puntos interesantes en la hipótesis de Mitchell, entre otros:

a) Las mitocondrias deben ser impérmables a los protones y en general a los iones para que sea posible el proceso. En realidad, la afirmación está de acuerdo con los datos experimentales.

b) La hidrólisis del ATP añadido externamente a mitocondrias que no estén respirando, debe producir una translocación de protones, translocación que también se producirá durante la oxidación de sustratos por mi-

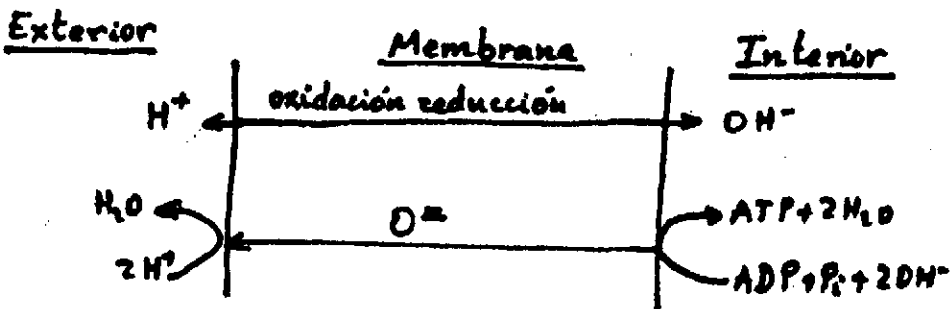
tocondrias. La translocación de protones será hasta el exterior y su magnitud proporcional al número de zonas o lugares de fosforilación atravesados por el transporte de electrones.

Figura 7. Cadena de transporte de electrones en la hipótesis quimiosmótica



En efecto, en 1965 Mitchell y Joyle trataron una suspensión de mitocondrias de hígado de rata en cloruro potásico a pH 7,2, con succinato como fuente de átomos de hidrógeno, manteniendo la mezcla a 25°, en ausencia de oxígeno y cuando introdujeron pequeñas cantidades de éste, se absorbe parte y se comprueba que en el medio externo se producen iones hidrógeno. La experiencia podría parecer bastante significativa, pero para dar una idea de las dificultades interpretativas, citaremos que los críticos de la teoría quimiosmótica señalan que la translocación de pro-

Figura 8. Fosforilación oxidativa



tones puede no ser un hecho primario unido directamente al transporte de electrones, sino que podría ser un efecto secundario, por ejemplo dependiendo energéticamente del transporte de cationes o de la hidrólisis de enlaces de alta energía de hidrólisis, y así Tager y colaboradores en *Nature* (1966) afirman que la eyección de H^+ no está acompañada por la oxidación de NADH que el movimiento de protones no está íntimamente unido al transporte de electrones sino que se puede deber a que existe un transporte de K^+ desde el exterior al interior de las mitocondrias (cuando se añade ATP) y que para compensar el desequilibrio eléctrico salen iones H^+ . Desde luego, Mitchell usaba un medio 150 mM en cloruro potásico.

c) Los desacopladores de la fosforilación podrían actuar simplemente aumentando la permeabilidad de las mitocondrias hacia los protones. Existen, en efecto trabajos con 2,4 DNP, en los que su acción parece ser ésta, sin que evite la barrera de permeabilidad a iones tales como Cl^- y K^+ .

d) Si se establece un gradiente de concentración de protones a través de la membrana, por adición externa de ácido o de base, se debe producir ATP. Jagendorf y colaboradores lo consiguieron en 1966 con cloroplastos en suspensión a pH 4,6 y que en la oscuridad se trasladaban a un medio que contenía ADP y Pi a pH 8, y por este simple hecho, consiguieron una síntesis considerable de ATP. Otros investigadores han demostrado que una diferencia de pH entre el interior y el exterior de cloroplastos se puede utilizar para hacerlos luminiscentes, lo que indicaría que la energía debida a una separación de carga a través de las láminas de cloroplastos puede invertir las reacciones hasta la etapa fotoquímica en que interviene la clorofila. Por otra parte, Jagendorf (1965 y 1966) ha comprobado también en cloroplastos en suspensión en un medio tamponado o débilmente tamponado, que tras iluminarlos 30 segundos (fotofosforilación) se produce una disminución del pH interno respecto al externo de hasta 2 unidades. Además, sustancias que permiten el flujo de electrones en la fotosíntesis, pero impiden la fotofosforilación, tales como el amoníaco, disminuían el cambio de pH y sustancias tales como los detergentes que probablemente actúan "agrietando" las láminas de los cloroplastos, destruyen rápidamente el gradiente de pH. La conclusión es que el sistema de fosforilación es análogo al propuesto para mitocondrias, ya que la única diferencia es que la ATP-asa actúa vectorialmente al revés, o sea ocasiona la acumulación de protones entre las laminillas y expulsión de iones hidroxilos al exterior.

Respecto a mitocondrias ¿se puede producir ATP provocando un gradiente de pH en la membrana? Han fracasado varios intentos pero Reid, Moye y Mitchell en 1966 (*Nature*) obtuvieron una pequeña cantidad de

ATP en mitocondrias de hígado de rata al bajar el pH desde 9 a 4,3 y en 1967 se ha demostrado una síntesis similar en mitocondrias vegetales.

Entonces, ¿cuál es la situación actual respecto a la teoría química y la quimiosmótica? Slater en 1967 (Eur. J. Bioch.) ha resumido las dificultades, entre las cuales quizás las más importantes sean la no existencia de experimentaciones que puedan obligar a escoger, conocidos sus resultados, entre ambas teorías. Un ejemplo lo hemos visto al tratar de la eyección de protones en mitocondrias. Por otra parte las dos teorías intentan aportar sus explicaciones a propiedades mitocondriales tales como la permeabilidad hacia iones o la turgencia y contracción.

La adición de Ca^{+2} en pequeñas cantidades a mitocondrias que están en medio Cl^- producen: 1) aumento de la respiración, proporcional al Ca^{+2} añadido; 2) alcalinización intramitocondrial; 3) eyección de protones; 4) toma global (99%) del Ca^{+2} del medio. No se toma Cl^- ni hay hinchazón mitocondrial.

En todos los casos (excepto alguna pequeña excepción como el K^+ quizá, inducido por la glándula paratiroide) la energía para el transporte activo se puede suministrar mediante a) una oxidación de sustrato, y la anaerobiosis o los inhibidores de transporte de electrones, inhiben, mientras que la oligomicina, por ejemplo no. b) ATP, no afectándose el fenómeno por anaerobiosis o inhibidores respiratorios y sí por oligomicina. Desacopladores como el DNP inhiben con ambas clases de energía a) o b).

Según Mitchell la separación de carga, mantiene una diferencia de potencial, lo cual es una forma de almacenar energía; energía potencial que se puede aprovechar para el transporte de iones, de tal modo que la entrada de Ca^{+2} vía portadores o permeasas específicas está asociada con la extrusión de protones. La correspondiente alcalinización intramitocondrial está comprobada por Chance, aunque el mismo Chance no ha conseguido revelar la presencia del gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial a menos que se añada Ca^{+2} en ausencia de anión permeable. Chance piensa en la participación directa de un intermedio de alta energía transportando el Ca^{+2} en forma de complejo a través de la membrana mitocondrial, con lo cual se rompe el intermedio de alta energía a otros componentes de menos energía.

Si el proceso de absorción de iones no hace inclinarse hacia una de las teorías, análogamente sucede en relación con la turgencia y contracción. La turgencia mitocondrial es un proceso que requiere energía y que se puede llevar a cabo bien con el concurso de la cadena respiratoria o por suministro de ATP. Durante la fase de turgencia, se observa una toma de cationes, acompañada de la expulsión de protones así como un aumento de la respiración. La presencia de DNP hace que más o menos directa-

mente, entren protones a las mitocondrias y entonces éstas se contraen. La teoría química postula la intervención de compuestos intermedios de alta energía y la quimiosmótica explica que durante la toma de oxígeno en condiciones que conducen a la turgencia, salen iones hidrógeno, entran cationes para equilibrar, además de los aniones correspondientes y la presión osmótica aumenta y las mitocondrias se hinchan. También un cambio interno de pH podría afectar la estructura, favoreciendo la turgencia. La contracción posterior, que no requiere energía tiene lugar al hacerse permeables las membranas mitocondriales y liberar a la vez aniones y cationes.

En 1967 Mintafa y col. han demostrado una turgencia rítmica moderada en mitocondrias con un período de unos dos minutos, y a la turgencia le acompaña una producción considerable de protones y a la contracción una disminución de ellos.

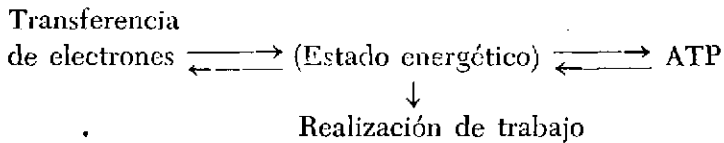
En cloroplastos como la distribución H^+/OH es al contrario, la fase de contracción sería la que requiere energía, y la turgencia es pasiva, o sea la contracción tiene lugar (Racker, 1966) cuando se acumulan iones H^+ en el interior.

Como conclusión de la discusión sobre estas 2 hipótesis hemos de señalar que la quimiosmótica caería abajo si se consiguiera la reconstrucción de la fosforilación oxidativa por un verdadero sistema soluble o por la demostración sin dudas de la intervención de un intermedio de alta energía común a la transferencia de energía y al transporte de electrones. De todos modos tampoco podemos olvidar otras hipótesis como la conformacional.

ACOPLAMIENTO CONFORMACIONAL

Boyer en 1966 ha indicado que no hay ninguna evidencia firme que obligue a postular la existencia de un compuesto específico con un enlace rico en energía, sugiriendo que el compuesto de alta energía $A - X$ de la hipótesis química indica meramente una forma o estado energético, de tal modo que la energía libre disponible de la oxireducción se conservaría como un cambio conformacional de una proteína u otra estructura asociada y que este cambio se acopla de algún modo a la reacción de fosforilación. El concepto se ha desarrollado a la vista de las posibles analogías entre la interacción de miosina con ATP y la fosforilación oxidativa. En el primer caso, se usa la ruptura de un enlace covalente para causar un cambio de conformación y en el segundo caso el cambio de conformación que acompañaría el transporte de electrones, causaría la formación de un enlace covalente.

Es interesante hacer resaltar que en un trabajo de Green y colaboradores, publicado en marzo de 1968 en Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., señalan la existencia de cambios conformacionales en membranas internas, demostrando que están asociados con la transferencia de energía y sosteniendo la tesis de que los cambios conformacionales son los acontecimientos primarios en el proceso de conservación de la energía al conseguir un denominado "estado energético", que está relacionado reversiblemente con la transferencia de electrones y la formación de ATP e irreversiblemente con la realización de trabajo:



En el proceso de fosforilación se habrían de distinguir los siguientes pasos: a) una "energización" de la membrana interna, inducida por un sustrato b) conversión, inducida por fosfato, de la membrana "energética" a una configuración especial; c) descarga del estado energético con la subsiguiente fosforilación, aunque también se puede aprovechar esa energía para translocaciones energéticas de iones.

BIBLIOGRAFIA GENERAL

Annual Review of Biochemistry, 1964, págs. 729-789.

Annual Review of Biochemistry, 1967, págs. 539-610.

Annual Review of Physiology, 1967, págs. 147-179.

Endeavour (ed. española), sept. 1967, págs. 134-139.

Mechanism in Bioenergetics, Racker, Academic Press, 1965.

