

## CONFERENCIA

# Un concepto unificado de transducción de energía por los sistemas bioquímicos\*

A unified concept of energy transduction by biochemical systems

MANUEL LOSADA

Departamento de Bioquímica, Facultad de Biología y Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad de Sevilla, Apdo. 1095, 41080-Sevilla, España.

Electronic energy—resulting either from electron excitation or localization—is the obligatory link between the different forms of energy (light, redox, acid-base, metaphosphate-orthophosphate) transducible by biochemical systems. The key in energy coupling between any two transducing systems lies precisely in the fact that both of them share a common intermediate that cyclically participates in the overall transduction process by alternating between its electronically energized state and its unenergized basal state. All the energy-transducing biochemical systems must operate, according to their nature and character of the energization, at two midpoint redox potentials, at two  $pK_a$ 's, or at two phosphate transfer potentials. Three basic energy-transducing systems in bioenergetics, namely, redox, acid-base and metaphosphate-orthophosphate, couple between them through the acylium cation  $[R-C=O]^+—$ carboxylate anion ( $R-COO^-$ ) pair. These forms are, respectively, twice-energized and unenergized and can accept, at two energy levels, either two electrons or two protons or the orthophosphate anion ( $H_2PO_4^-$ ) and the “zwitterion” metaphosphate ( $\sim PO_3^{--}$ ). Both at the substrate level and at the membrane level, orthophosphate energization to metaphosphate, by removal of an oxide anion ( $O^{2-}$ ), brings about a decrease in  $pK_a$  with the concomitant dissociation of the two protons ( $2H^+$ ), whereas deenergization of metaphosphate to orthophosphate, by addition of an oxide anion, brings about an increase in  $pK_a$  with the concomitant fixation of two protons. One of the greatest discoveries of bioenergetics was the introduction in cell metabolism of the one-electron redox photosystem chlorophyll *a* and was followed by the starting of the one-electron/one-proton redox/acid-base energy-transducing systems of the photosynthetic and respiratory electron transport chains.

### INTRODUCCION

La fusión termonuclear es la fuente primaria de energía en nuestro Sol (hacia 1 Mton  $s^{-1}$  de materia aniquilada  $\approx 10^{26}$  W). A su vez, la vida en nuestro planeta depende de manera admirable y casi absoluta de la energía solar radiante que incesantemente llega a la biosfera en cantidades ingentes (hacia  $10^{17}$  W  $\approx 3 \times 10^{24}$  J  $año^{-1}$ ), donde es parcialmente convertida (hacia  $10^{14}$  W  $\approx 3 \times 10^{21}$  J  $año^{-1}$ ) en energía química por el reino vegetal durante la fotosíntesis. La fotosíntesis es, ciertamente, el único mecanismo para atrapar, transducir y almacenar la energía luminosa del Sol en biomasa (hacia  $3 \times 10^{21}$  J  $año^{-1} \approx 200$  Gton

$año^{-1}$ ) y oxígeno molecular (Guerrero y Losada, 1983; Losada, 1985).

La fotosíntesis consiste esencialmente en la transducción de la energía luminosa en energía electrónica y subsiguientemente en energía redox. Esta energía es posteriormente utilizada—más o menos directamente y tras su transformación parcial en otras formas de energía— en la oxidación del agua (Van Niel, 1941; Warburg, 1964; Hill, 1965; Metzner, 1981; Govindjee, 1982) y en la reducción y asimilación de los bioelementos primordiales, a saber, carbono, nitrógeno, azufre y fósforo (Calvin y Bassham, 1962; Losada, 1976; Losada y Guerrero, 1979; Bothe y Trebst, 1981). De hecho, parte de la energía redox

\* Conferencia plenaria en la XXVIII Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Chile (Pucón, noviembre 1985).

generada fotosintéticamente es convertida eventualmente —también a través de energía electrónica— en energía metafosfato-ortofosfato (Arnon, 1977) para coadyuvar más tarde en las reacciones reductivas y asimilatorias de los bioelementos. En efecto, al pasar de nuevo a ortofosfato, el metafosfato permite, por un lado, la energetización de los electrones a un nivel aún más alto y, por otro, la polimerización, por deshidratación, de los sillares moleculares fotosintetizados (aminoácidos, nucleótidos, azúcares, ácidos grasos) en los componentes mayoritarios del material celular (proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos, lípidos).

En contraposición con la fotosíntesis, la respiración consiste esencialmente en la transducción —más o menos directa, pero también a través de energía electrónica— de la energía redox almacenada en los bioelementos reducidos y en el oxígeno molecular en energía metafosfato-ortofosfato (Lipmann, 1941; Krebs y Kornberg, 1957; Warburg, 1964; Lehninger, 1965; Keilin, 1966).

Uno de los grandes avances en el mecanismo de la síntesis de ATP a nivel de membrana, tanto en el proceso de la fosforilación fotosintética (Arnon, 1977) como de la oxidativa (Lehninger, 1965; Kalkar, 1969; Ochoa, 1980), fue la proposición, en los años 60, de la hipótesis quimiosmótica por Mitchell. Este autor formuló (1961, 1979) que la energía redox liberada durante el transporte de electrones a lo largo de las cadenas fotosintética y respiratoria genera, a través de las respectivas membranas, un gradiente electroquímico de protones que es utilizado por las ATP sintasas para la fosforilación del ADP. Hay que enfatizar, sin embargo, que el mecanismo de estos dos procesos de acoplamiento energético en las membranas tilacoidales, citoplásmicas bacterianas y mitocondriales continúa siendo uno de los retos más importantes de la moderna biología a resolver por los bioenergetistas (Boyer *et al.*, 1977; Williams, 1978; Carafoli y Scarpa, 1982; Slater *et al.*, 1985).

Nosotros hemos propuesto recientemente (Losada, 1978; 1979a, 1985; Losada *et al.*, 1983) un concepto unificado de

la transducción biológica de la energía, en el sentido de que la energía electrónica —resultante bien de la excitación o bien de la localización de los electrones— es el eslabón intermediario obligatorio entre las diferentes formas de energía (luminosa, redox, ácido-base, metafosfato-ortofosfato) transducibles por los sistemas bioquímicos. El punto clave del acoplamiento energético entre dos sistemas transductores cualesquiera estriba precisamente en que ambos comparten un intermediario común, que cíclicamente participa en el proceso global de transducción de una forma de energía en otra, alternando entre un estado electrónicamente energetizado y un estado basal desenergetizado. Ciertamente, para funcionar como tales, todos los sistemas bioquímicos transductores de energía han de ser capaces de operar —de acuerdo con su naturaleza y carácter de la energetización— a dos potenciales redox estándar  $E'_m$  (aceptando y cediendo uno o dos electrones a dos niveles de energía), a dos  $pK_a$  (aceptando y cediendo uno o dos protones a dos niveles de energía), o a dos potenciales de transferencia de fosfato,  $PTP$ , es decir, aceptando y cediendo, o viceversa, un anión metafosfato monomérico doblemente energetizado ( $\sim\text{PO}_3^{2-}$ ) y un anión ortofosfato estabilizado, en su forma desprotonada ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) o diprotonada ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ).

Es muy importante subrayar, para comprender una parte esencial de este trabajo, que el catión acilio [ $\text{R}-\text{C}=\text{O}$ ] $^{**}$  —estabilizado cinética, que no energéticamente, de manera usual como tioéster— es la forma doblemente energetizada, por remoción de un anión óxido ( $\text{O}^{2-}$ ), de la forma estable del anión carboxilato ( $\text{R}-\text{COO}^-$ ), y que este par ( $1/2 \text{ eV molécula}^{-1}$ ) actúa como intermediario común universal en la transducción de las otras formas de energía, a saber, redox (dos electrones), ácido-base (dos protones) y metafosfato-ortofosfato (un grupo). Igualmente importante es resaltar que la desenergetización del anión metafosfato —que es, de hecho, un “zwitterion” metafosfato, o fosforilio ( $\sim^+\text{PO}_3^{2-}$ ,  $\sim^{2+}\text{PO}_3^{3-}$ ), usualmente estabilizado cinética, que no energéticamente, por su unión al ADP— a anión ortofosfato (ha-

cia  $1/3 \text{ eV molécula}^{-1}$ ) conlleva la adición de un anión óxido ( $\text{O}^{2-}$ ), primero, y de dos protones ( $2 \text{ H}^+$ ), después, o de agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) en su caso, y que la energetización del ortofosfato a metafosfato es promovida por la remoción de un anión óxido y va seguida de la disociación de sus dos protones.

En resumen, podemos concluir que durante el proceso fotosintético tiene lugar la siguiente transducción secuencial de la energía luminosa en energía química por los organismos fotoergónicos: los fotones ( $h\nu$ ) energetizan primero a los electrones ( $e \rightarrow e^*$ ) a través del fotosistema redox clorofila *a* de los centros de reacción; subsiguientemente, los electrones energetizan a los protones ( $\text{H}^+ \rightarrow \text{H}^{+*}$ ), a través de las cadenas cíclica y no-cíclica de transporte de electrones; a su vez, los protones energetizan el ortofosfato ( $\text{P}_i$ ) a metafosfato, o fosfato rico en energía ( $\sim\text{P}^{**}$ ), a través de la ATP sintasa (fosforilación fotosintética); finalmente, el metafosfato transfiere su energía, desenergetizándose a ortofosfato, durante la reducción y asimilación de los bioelementos.

Posteriormente, durante el proceso respiratorio, tiene lugar la siguiente transducción secuencial de la energía redox en ATP por los organismos quimioergónicos: primero, en las fases preparatorias de la respiración —glicólisis y ciclo oxidativo de los ácidos tricarbónicos— los electrones energetizan directamente el ortofosfato a metafosfato (fosforilación a nivel de sustrato); después, en la fase respiratoria propiamente dicha —cadena respiratoria—, los electrones energetizan a los protones y, a continuación, éstos, a través de la ATP sintasa, el ortofosfato a metafosfato (fosforilación oxidativa).

#### Ciclo de electrones y protones en bioenergética

Como muestra la Figura 1, el proceso fotosintético implica a escala mundial el bombeo ininterrumpido, a una diferencia de potencial de aproximadamente un voltio, de una cantidad astronómica de electrones (hacia  $10^{33} \text{ e s}^{-1} \approx 1 \text{ Gmol e}$

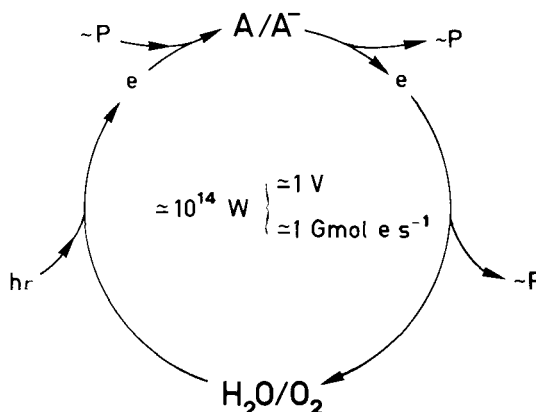


Fig. 1: Ciclo de los electrones en bioenergética. Durante la fotosíntesis, los electrones procedentes de la oxidación del agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ) a oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ) son impulsados cuesta arriba, primero, a expensas de energía luminosa ( $h\nu$ ), hasta el nivel de potencial del electrodo de hidrógeno ( $e$ ) y, después, a expensas de energía metafosfato ( $\sim\text{P}$ ), hasta el nivel de potencial de los bioelementos primordiales, cuyas formas oxidadas ( $\text{A}$ ) se reducen durante el proceso. Posteriormente, durante la respiración, los electrones suministrados por los bioelementos reducidos ( $\text{A}^-$ ) caen cuesta abajo, primero hasta el nivel de potencial de los coenzimas redox que surten la cadena respiratoria ( $e$ ) y, después, en cascada, hasta el oxígeno molecular, que se reduce a agua. La energía redox liberada durante las fases anaeróbica y aeróbica de la respiración se transduce eventualmente, a nivel de sustrato y de membrana, respectivamente, en energía metafosfato ( $\sim\text{P}$ ). A escala mundial, el ciclo implica el bombeo incesante, a una diferencia de potencial del orden de un voltio, de hacia un gigamol de electrones por segundo, lo que requiere un consumo de energía de hacia cien terawatios.

$\text{s}^{-1}$ ) desde el agua (hacia  $10^4 \text{ ton s}^{-1}$ ) a los bioelementos oxidados (hacia  $100 \text{ Gton año}^{-1}$  de carbono y  $10 \text{ Gton año}^{-1}$  de nitrógeno) y conlleva, primero, la transducción de la energía luminosa en energía redox y, después, la de parte de ésta —a través de energía ácido-base— en energía metafosfato-ortofosfato, que es de nuevo convertida en energía redox para subir los electrones a su más alto nivel. El ciclo fundamental de los electrones en bioenergética se cierra posteriormente al ceder los bioelementos reducidos sus electrones al oxígeno molecular, transferencia que incluye —como etapas sucesivas en la caída de los electrones— las fases anaeróbica, primero, y aeróbica, después, de la respiración. El proceso respiratorio conlleva la transducción directa e indirecta, a través de energía ácido-base, de la energía redox en energía metafosfato-ortofosfato

(Losada, 1976, 1978, 1979a; Losada y Guerrero, 1979; Losada *et al.*, 1983).

En consecuencia, la fotosíntesis es un proceso endergónico (a expensas de la energía de la luz) que consiste esencialmente en la oxidación del agua a oxígeno molecular a alto potencial ( $E_m'$ , pH 7, +0,82 V), es decir, a baja tensión de electrones ( $e$ ), y en la reducción concomitante —seguida de su asimilación— de los bioelementos oxidados a sus formas reducidas a bajo potencial, más o menos similar al del electrodo de hidrógeno ( $E_m'$ , pH 7, -0,42 V), es decir, a alta tensión de electrones ( $e^*$ ). Por el contrario, la respiración es un proceso exergónico acoplado a la síntesis de ATP, que consiste básicamente en la oxidación de los bioelementos reducidos a sus formas oxidadas y en la reducción concomitante del oxígeno molecular a agua.

Es importante mencionar que tanto la fotosíntesis como la respiración son procesos redox que conllevan la liberación y fijación de protones como consecuencia de la oxidación y reducción de sus respectivos sustratos (Losada, 1978, 1979a, 1985; Losada y Guerrero, 1979; Losada *et al.*, 1983). Así, el proceso redox fotosintético va acompañado de la liberación de protones a bajo pH ( $H_1^{+*}$ ), al oxidarse el agua en el espacio interno (*i*) intratrilacoidal, y de la fijación de protones a alto pH ( $H_0^+$ ), al reducirse los bioelementos oxidados (A) a sus formas reducidas ( $AH_n$ ) en el espacio externo (*o*) extratrilacoidal, de acuerdo con el esquema de la Figura 2 y de las siguientes ecuaciones:

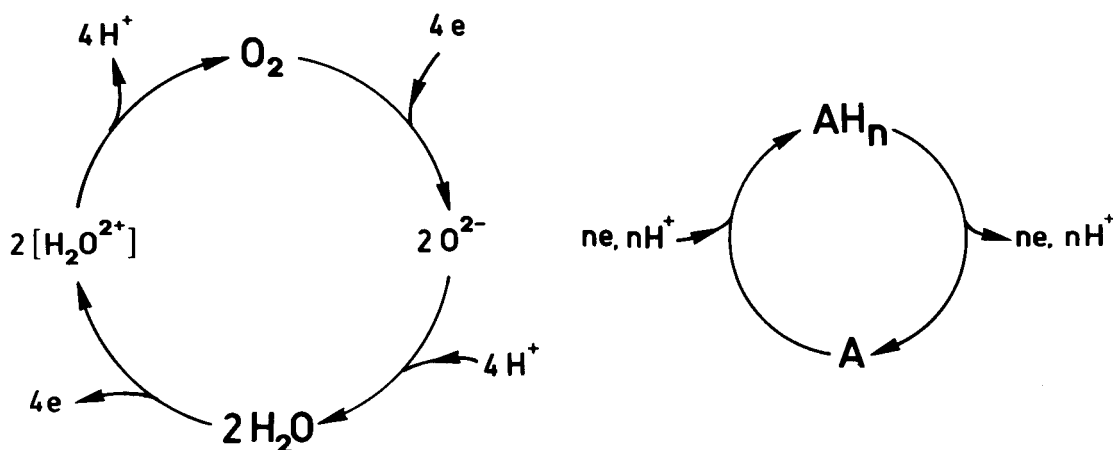
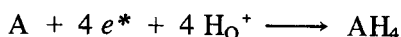
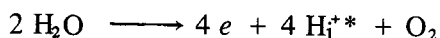


Fig. 2: Oxido-reducción del agua y de los bioelementos primordiales. La oxidación fotosintética del agua ( $2 H_2O$ ) a oxígeno molecular ( $O_2$ ) conlleva la remoción de cuatro electrones ( $4 e$ ) y la disociación subsiguiente de cuatro protones ( $4 H^+$ ). La reducción respiratoria del oxígeno molecular a agua conlleva la adición de cuatro electrones y la fijación subsiguiente de cuatro protones por los dos aniones óxido ( $2 O^{2-}$ ) resultantes. La reducción de los bioelementos oxidados (A) lleva consigo la fijación de un cierto número ( $n$ ) de electrones y protones, en tanto que la oxidación de los bioelementos reducidos lleva consigo la liberación del mismo número de electrones y protones.

Interesa también destacar que si los sustratos oxidados son, además, especies oxigenadas —como el  $CO_2$ ,  $NO_3^-$  y  $SO_4^{2-}$ — su reducción va acompañada de la remoción parcial o total de los pertinentes aniones óxido por protones (véase más adelante). En consecuencia, al menos en la fotosíntesis, parte de la energía redox generada por la clorofila *a* de los centros de reacción de los fotosistemas I y II (PS I

y PS II) promueve, de este modo, un gradiente electroquímico transmembranal de protones (Fig. 3), que puede, a su vez, utilizarse en la energización del ortofosfato a metafosfato por la ATP sintasa. El gradiente electroquímico de protones que se establece entre los espacios intra y extratrilacoidal actúa, según la propuesta de Mitchell (1961, 1979), como fuerza protonmotriz, compuesta de un gradiente

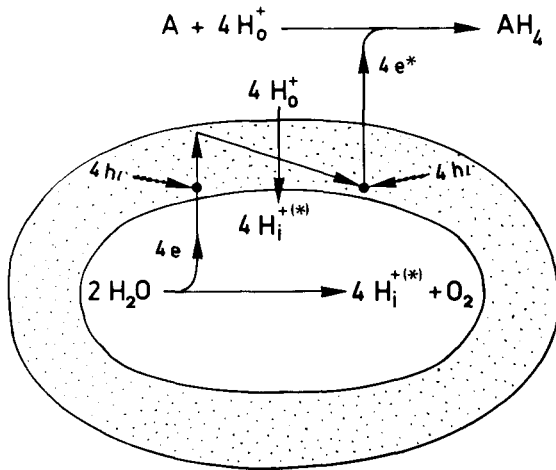
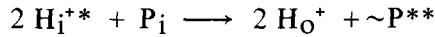


Fig. 3: Oxidación del agua en el espacio intratilacooidal y reducción de los bioelementos primordiales en el espacio extratilacooidal durante la fotosíntesis. Ocho cuantos de luz ( $4 h\nu + 4 h\nu$ ) son requeridos para la transferencia contra gradiente, a través de los dos fotosistemas, de cuatro electrones ( $4 e \rightarrow 4 e^*$ ) del agua ( $2 H_2O$ ) a los bioelementos oxidados (A). El proceso redox va acompañado, por una parte, de la liberación, a bajo pH, de cuatro protones ( $4 H_i^{+*}$ ) en el espacio intratilacooidal y, por otra, de la fijación, a alto pH, de otros cuatro ( $4 H_o^+$ ) en el espacio extratilacooidal. Además, por cada electrón transferido a través de la cadena no cíclica de transporte, se transloca un protón, lo que, en conjunto, supone un total de cuatro protones ( $4 H_o^+$ ) removidos del espacio extratilacooidal e introducidos ( $4 H_i^{+*}$ ) en el intratilacooidal, con la consiguiente potenciación del pertinente gradiente electroquímico.

de protones, o gradiente de pH (ácido en el interior), y de un potencial de membrana (positivo en el interior). El que en la respiración ocurra también un fenómeno análogo es discutible (Losada, 1978, 1979a), ya que tanto la oxidación de los sustratos reducidos como la reducción del oxígeno molecular tienen aparentemente lugar en los espacios intramembranales e intramitocondriales (Lehninger, 1965).

Por otro lado, y de acuerdo, en principio, con la teoría quimiosmótica de Mitchell (1961, 1979), parte de la energía redox producida por la clorofila *a* de los centros de reacción de los fotosistemas se utiliza también —durante el flujo cíclico y no cíclico de electrones— en la generación de un gradiente electroquímico de protones y eventualmente en la síntesis de fosfato rico en energía, procesos que ocurren vectorial y secuencialmente en la membrana tilacooidal a través de la translocación de protones por los citocromos

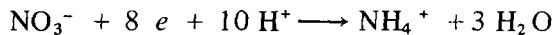
*b*, en un sentido (véase Fig. 3 y más adelante), y por la ATP sintasa, en el inverso, de acuerdo con las siguientes ecuaciones:



Análogamente, la energía redox respiratoria se transduce —durante el transporte de electrones en las membranas citoplásmica y mitocondrial interna— en energía ácido-base y eventualmente en energía metafosfato-ortofosfato, procesos que ocurren, también vectorial y secuencialmente, a través de los complejos I (NADH deshidrogenasa), III (citocromo *b*) y IV (citocromo *a*<sub>3</sub>) de la cadena respiratoria y de la ATP sintasa, respectivamente (véase más adelante).

#### Reducción y oxidación de los bioelementos primordiales

La reducción asimilatoria de los bioelementos requiere o no, según sea el caso, además de energía redox y protones, energía adicional de fosfato rico en energía. Por ejemplo, la reducción del nitrato (estado de oxidación +5), vía nitrito (+3), a amoníaco (-3) requiere ocho electrones y el concurso de diez protones, quedando cuatro de ellos unidos directamente al átomo de nitrógeno reducido y utilizándose los seis restantes en la remoción, como agua, de los tres aniones óxido del nitrato, según la ecuación:

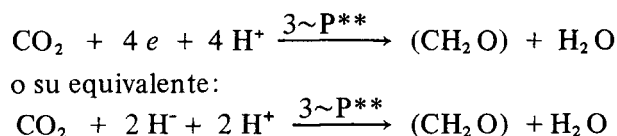


Puesto que el potencial redox medio de la ferredoxina ( $E_m'$ , pH 7, -0,42 V) y del piridín nucleótido ( $E_m'$ , pH 7, -0,32 V) —coenzimas que actúan, según los casos, como donadores de electrones de los enzimas implicados— es más negativo que el de los pares aceptores nitrito/nitrato ( $E_m'$ , pH 7, +0,42 V) y amonio/nitrito ( $E_m'$ , pH 7, +0,33 V) —que, secuencialmente, participan en la ruta asimilatoria de reducción del nitrato a amonio—, ambos pasos son exergónicos a pH fisiológico, no precisando, por tanto, la reacción de ninguna

energía adicional (Losada, 1978; Guerrero *et al.*, 1981; Losada *et al.*, 1981).

En cambio, la reducción, a pH fisiológico, del dióxido de carbono (estado de oxidación +4) a carbohidrato (0) requiere

no sólo cuatro electrones y cuatro protones, sino el concurso de tres moléculas de fosfato rico en energía (Calvin y Bassham, 1962), de acuerdo con la ecuación simplificada:



Desde un punto de vista potenciométrico y bioenergético (Losada, 1978, 1979a, 1985; Losada *et al.*, 1983), la explicación de este hecho es sencilla: en primer lugar, el anhídrido carbónico no se reduce directamente, como es el caso para el nitrato, sino después de su fijación a la ribulosa-bisfosfato, apareciendo, tras un curioso reajuste redox, como anión carboxilato en una de las dos moléculas de 3-fosfoglicerato resultantes. La reacción de carboxilación conlleva, además, la fijación concomitante de una molécula de agua y la disociación de sus dos protones. En segundo lugar, el potencial redox del par 3-fosfogliceraldehído/3-fosfoglicerato es demasiado negativo ( $E_m'$ , pH 7, -0,54 V) —por lo que no permite la reducción directa por el piridín nucleótido ( $E_m'$ , pH 7, -0,32 V)— pero se incrementa en +0,25 V al energetizarse la forma oxidada del par a 1,3-bisfosfoglicerato ( $E_m'$ , pH 7, -0,29 V). La fosforilación del 3-fosfoglicerato resulta de hecho en la energetización de su propio grupo aniónico carboxilato ( $\text{R}-\text{COO}^-$ ) a catión acilio  $[\text{R}-\text{C}=\text{O}]^{**+}$

y es concomitante con la desenergetización del metafosfato ( $\sim\text{PO}_3^{-**}$ ) a ortofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ). Este proceso de transducción de energía (Fig. 4) conlleva no sólo la remoción por el metafosfato del anión óxido del grupo carboxilato, sino la fijación de dos protones del medio por el ortofosfato resultante, que, respecto al me-

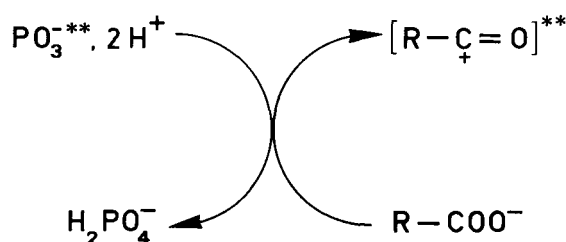
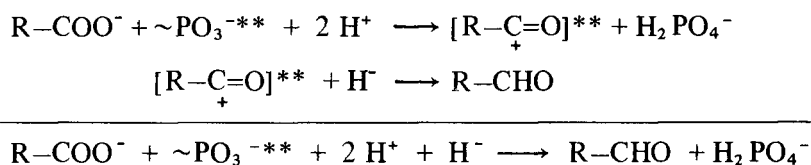


Fig. 4: Energetización del anión carboxilato a catión acilio por el "zwitterion" metafosfato. El metafosfato ( $\sim\text{PO}_3^{-**}$ ), actuando como fosfocación, remueve un anión óxido ( $\text{O}^{2-}$ ) del anión carboxilato ( $\text{R}-\text{COO}^-$ ), que se energetiza a catión acilio  $[\text{R}-\text{C}=\text{O}]^{**+}$ , a la par que el metafosfato se desenergetiza a anión ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) y fija dos protones ( $2 \text{H}^+$ ).

tafosfato, exhibe  $pK_a$  más altos. En otras palabras, el anión metafosfato —que es también fosfocación por su carácter de "zwitterion"— actúa primero como un ácido fuerte, al sustraer un anión óxido del anión carboxilato, y a continuación, una vez desenergetizado a ortofosfato, como una base fuerte ( $pK_a = 7,2$  y  $12,7$ ) captadora de dos protones del medio. Finalmente, el catión acilio formado acepta, a alto potencial, el anión hidruro del piridín nucleótido reducido y se transforma en grupo aldehído. Las reacciones de energetización del anión carboxilato por el ión híbrido metafosfato y de reducción del catión acilio resultante por el anión hidruro a aldehído (Fig. 5) se pueden resumir en las dos siguientes ecuaciones:



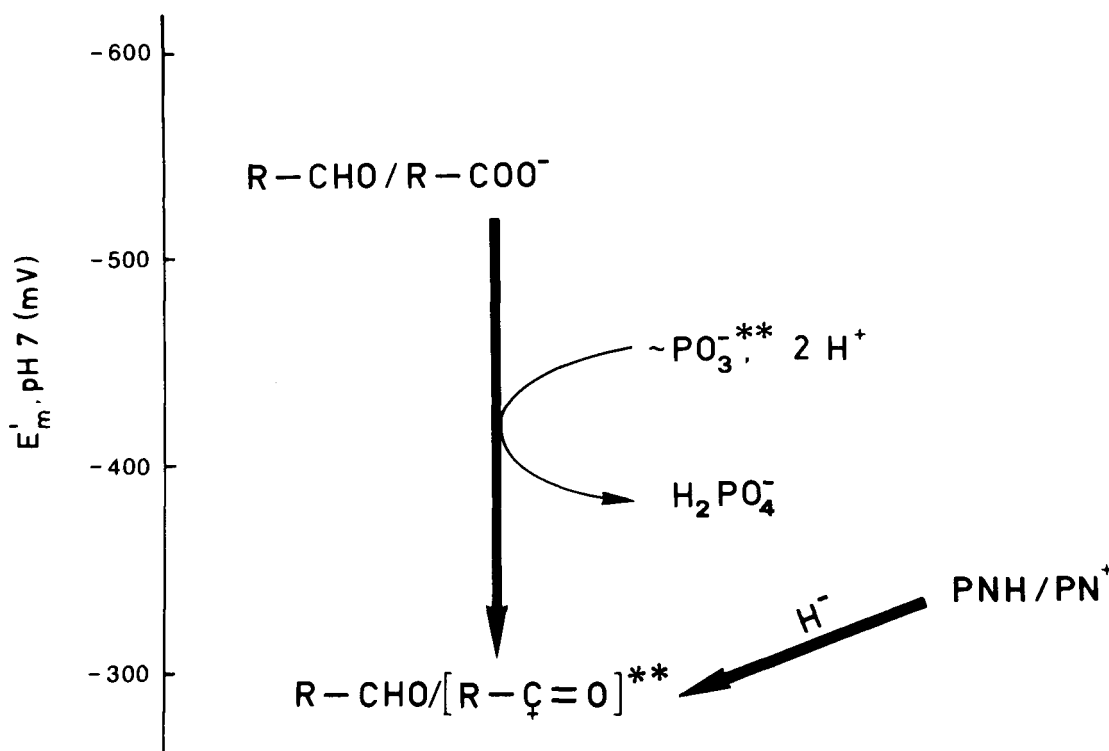
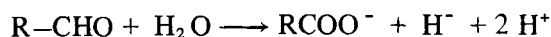


Fig. 5: Representación esquemática de la reducción contra gradiente, a expensas de energía metafosfato, del anión carboxilato a aldehído por el piridín nucleótido. Primero, el anión carboxilato ( $R-COO^-$ ) se energiza a catión acilio [ $R-C=O$ ]\*\* por el "zwitterion" metafosfato ( $\sim PO_3^{**}$ ), que, a su vez, se desenergiza a ortofosfato y fija dos protones ( $H_2PO_4^-$ ). A continuación, el catión acilio se reduce a aldehído ( $R-CHO$ ) a alto potencial ( $-0,29$  V) aceptando, más o menos isopotencialmente ( $-0,32$  V), un ión hidruro ( $H^-$ ) de la forma reducida del piridín nucleótido (PNH). El resultado neto del proceso es la reducción, a bajo potencial ( $-0,54$  V), del anión carboxilato a aldehído a expensas de la energía metafosfato-ortofosfato ( $1/3$  eV molécula $^{-1}$ ), que permite la subida de dos electrones a una diferencia de potencial de  $0,22$  V.

que, en conjunto, equivalen a la reducción directa del anión carboxilato a grupo aldehído a bajo potencial:

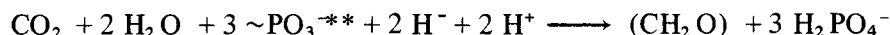


A este respecto es interesante mencionar que las células de los organismos fotosintéticos eucarióticos contienen un nuevo tipo de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Arnon *et al.*, 1954; Jacob y d'Aurac, 1972; Kelly y Gibbs, 1973; Pupillo y Faggiani, 1979) que específicamente oxida con  $NADP^+$  el grupo aldehído de la triosa a anión carboxilato, sin que, como es usual, la reacción se acople con la energización del ortofosfato a través de un catión acilio intermediario, sino que transcurre directamente según la ecuación:



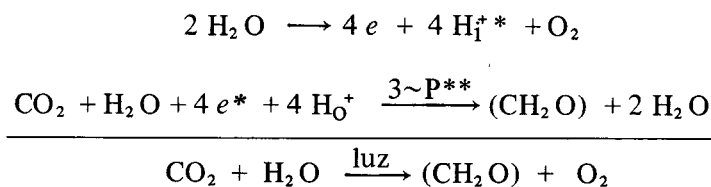
En consecuencia, esta reacción de oxidación es muy exergónica en condiciones estándar, lo que —en condiciones fisiológicas y dependiendo de la localización y función de la enzima— puede implicar una sobrerreducción del  $NADP^+$  a  $NADPH$  y/o una acidificación del medio, aparte de una vía más fácil para la producción de 3-fosfoglicerato.

Teniendo en cuenta que la reducción de una molécula de  $CO_2$  hasta el nivel de carbohidrato requiere —además de un grupo metafosfato por cada par de electrones, es decir, dos en conjunto— un tercer grupo metafosfato —que eventualmente sólo suministra energía a través de su hidrólisis— podemos resumir el proceso global de su asimilación reductiva en el estroma según la siguiente ecuación:

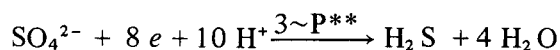


Los cuatro electrones que, como dos iones hidruro, requiere la reducción del  $\text{CO}_2$  a carbohidrato proceden de la fotooxidación de dos moléculas de agua, siendo, por lo demás, el proceso redox concomitante con la liberación de cuatro protones en el espacio intratilacoidal y con la remoción de otros tantos protones en el estroma. Simultáneamente (véase más adelante), dos moléculas de ortofosfato se energizan a metafosfato por la acción del propio gradiente electroquímico de protones, disociando, por cada molécula, un anión óxido hacia el espacio intratilacoidal y dos protones hacia el estroma, para, seguidamente, desenergetizarse de nuevo a ortofosfato por remoción de dos

aniones óxido del  $\text{CO}_2$  —tras su fijación como anión carboxilato en dos moléculas de fosfoglicerato— y de los cuatro protones liberados en el estroma. Por otro lado, la fijación del  $\text{CO}_2$  por la ribulosa-bifosfato conlleva también la fijación de una molécula de agua y la disociación de sus dos protones, que, en unión de los cuatro electrones procedentes de la fotooxidación del agua, equivalen a los dos iones hidruro. Dejando al margen intencionadamente la translocación concomitante de protones, durante el flujo cíclico y no cíclico de electrones, y la fosforilación adicional a ella acoplada, el balance de la asimilación fotosintética del  $\text{CO}_2$  es, pues:

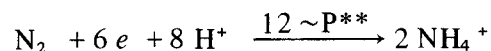


La reducción de sulfato (estado de oxidación +6) a sulfito (+4) —primer paso en la ruta asimilatoria de reducción del sulfato a sulfuro— también requiere la energización de la forma oxidada del par, o sulfato —en este caso por adenililación—, y conlleva, igualmente, la remoción de un anión óxido, lo que se traduce en el aumento de potencial redox del par sulfito/sulfato. En cambio, la reducción de sulfato (+4) a sulfuro (–2), como la de nitrito a amonio, y por las mismas razones potenciométricas, no requiere energía adicional (Losada, 1976, 1978; Bothe y Trebst, 1981). En conjunto, la reducción de sulfato a sulfuro, que requiere ocho electrones y el concurso de diez protones, conlleva la remoción de cuatro aniones óxido y puede resumirse según la ecuación simplificada:



Por último, la reducción de dinitrógeno (estado de oxidación 0) a amonio (–3)

requiere elevadas cantidades de ATP, sin que, hasta la fecha, se haya podido establecer el mecanismo de esta reacción. Parece, no obstante, probable que la energía del ATP se utilice en energizar los electrones o protones que conlleva el proceso, al interaccionar con los sustratos y/o con las proteínas que participan en el mismo (Losada, 1978; Zumft, 1981; Losada *et al.*, 1983). En contraste con las reacciones hasta ahora consideradas de reducción del nitrato, dióxido de carbono y sulfato, la reducción del dinitrógeno a ión amonio no conlleva remoción de aniones óxido, sino exclusivamente protonación a tope de los dos átomos de nitrógeno reducidos resultantes, conforme a la ecuación;



La reducción, a expensas de la energía luminosa, del nitrógeno atmosférico a amoníaco por las algas verde-azuladas, o cianobacterias, es uno de los ejemplos más sim-



ples e interesantes de fotosíntesis que se conocen (Guerrero *et al.*, 1982).

En relación con la disimilación de los hidratos de carbono sorprende que sea un hecho comúnmente ignorado el que, durante la glicólisis, el catión acilio —resultante de la oxidación del grupo aldehído de la triosa-fosfato por el piridín nucleótido— se desenergetice a anión carboxilato al sustraerle un anión óxido al ortofosfato, que, como consecuencia, se energetiza a metafosfato, a la par que disocia sus dos protones por disminuir con la energetización sus respectivos  $pK_a$ . En otras palabras, el ortofosfato actúa primero como una base muy débil, al ceder su anión óxido al catión acilio, y a continuación, una vez energetizado a metafosfato, como un ácido diprótico más fuerte ( $pK_a = 4,1$  y  $6,9$ ) que disocia sus dos protones y se fija al ADP. Consecutivamente, dos protones son, a su vez, también captados por los productos de demolición del azúcar. Resulta por ello paradójico que en esta peculiar deshidratación del ortofosfato a metafosfato no parezca intervenir el azúcar, a pesar de que es, a su través —concretamente, en la

reacción catalizada por la enolasa—, como se elimina el agua.

La Figura 6 muestra, de una manera muy simplificada y esquemática, las reacciones básicas que participan durante la fermentación alcohólica (Sols *et al.*, 1971) en la energetización del ortofosfato a metafosfato y en la dismutación redox y deshidratación del azúcar, secuencia de reacciones acopladas, que —para evitar duplicidades— hemos referido aquí a sólo una molécula de triosa. Es muy importante constatar que la esencia del acoplamiento energético consiste en la remoción del anión óxido del ortofosfato por el catión acilio, primero, y en la disociación espontánea de sus dos protones, después, que son captados más o menos directamente, uno por el acetaldehído, resultante de la descarboxilación del piruvato, y el otro por el etanol, resultante de la propia reducción del acetaldehído merced al piridín nucleótido transportador del anión hidruro procedente de la oxidación del grupo aldehído de la triosa. En resumen (Fig. 7), la energía redox liberada en la caída de dos electrones durante la oxidorreducción intra-

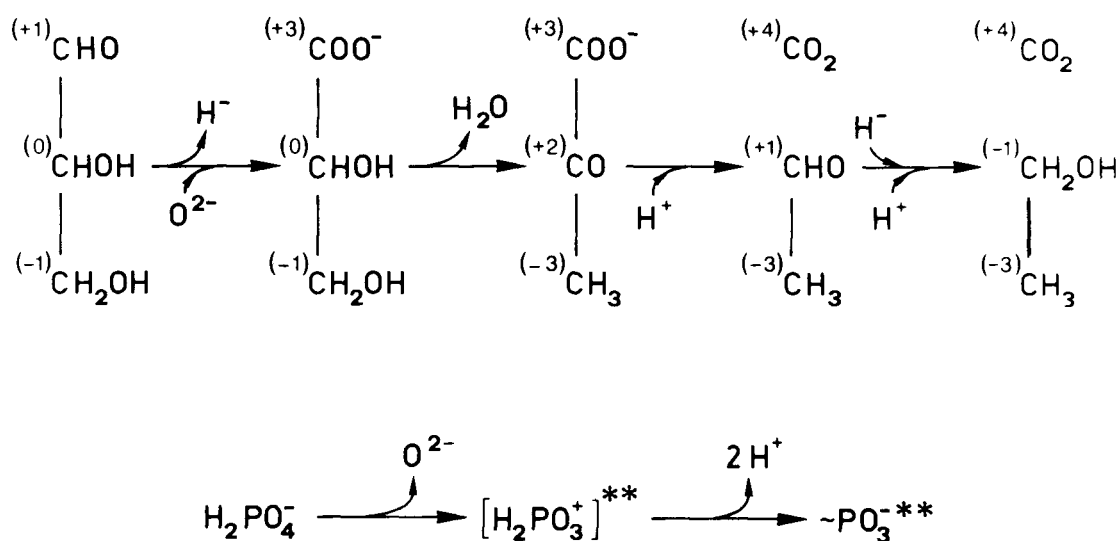


Fig. 6: Energetización del ortofosfato a metafosfato a expensas de la caída de potencial de los electrones durante la fermentación alcohólica. El grupo aldehído (+1) de la triosa se oxida a anión carboxilato (+3) cediendo su ión hidruro ( $\text{H}^-$ ) al piridín nucleótido oxidado y aceptando un anión óxido ( $\text{O}^{2-}$ ) del ortofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), que, en consecuencia, se energetiza a metafosfato ( $\text{-PO}_3^{-**}$ ) y disocia sus dos protones ( $2 \text{H}^+$ ). El glicerato resultante de óxido reduce intramolecularmente por la acción de la enolasa, con eliminación de agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ), pasando su grupo alcoholico secundario (0) a grupo cetónico (+2), y su grupo alcoholico primario (-1) a grupo metilo (-3). El piruvato se descarboxila, fijando un primer protón ( $\text{H}^+$ ) el carbanión del acetaldehído resultante. El carbocatión del grupo aldehído de éste (+1) acepta el ión hidruro ( $\text{H}^-$ ) que retorna el piridín nucleótido reducido y se reduce a grupo alcoholico (-1), a la par que el anión alcoholato resultante fija el segundo protón ( $\text{H}^+$ ).

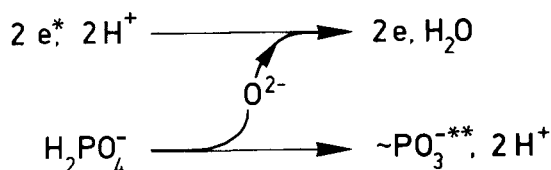
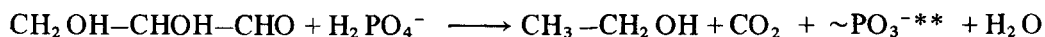
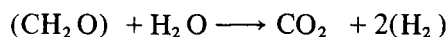


Fig. 7: Acoplamiento entre energía redox y energía metafosfato-ortofosfato en la fermentación alcohólica. La caída de potencial de dos electrones ( $2 e^* \rightarrow 2 e$ ) durante la oxidorreducción intramolecular de la triosa a etanol y dióxido de carbono promueve la remoción directa por parte de ésta de un anión óxido ( $O^{2-}$ ) del ortofosfato ( $H_2PO_4^-$ ), que se energetiza a metafosfato ( $\sim PO_3^{-**}$ ) y disocia sus dos protones ( $2 H^+$ ). Estos dos protones son captados del medio por los productos de demolición del azúcar e indirectamente eliminados, como agua ( $H_2O$ ), en conjunción con el anión óxido previamente removido.

molecular de la triosa ( $2 e^* \rightarrow 2 e$ ) permite la remoción directa de un anión óxido ( $O^{2-}$ ) del ortofosfato ( $H_2PO_4^-$ ) y su eliminación indirecta, como agua ( $H_2O$ ), gracias a los dos protones ( $2 H^+$ ) que el



La conclusión de varios de los más destacados bioenergetistas de nuestra época (Wald, 1966; Racker, 1976; Wieser, 1981; Robertson, 1983) de que el agua suministra la mitad del poder reductor durante la respiración de los carbohidratos es, por lo demás, una falacia resultante del siguiente razonamiento elemental erróneo:



El agua sólo actúa biológicamente como donadora de electrones (y protones) en fotosíntesis, suministrando únicamente aniones hidróxido, u óxido, y protones cuando se disocia como ácido-base (Losada, 1978, 1979a, 1985; Losada y Guerrero, 1979; Atkinson, 1981; Herreros y García Sancho, 1981; Losada *et al.*, 1983).

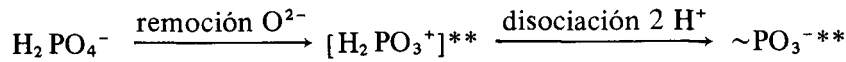
#### El ciclo ortofosfato-metafosfato en bioenergética

Uno de los ciclos fundamentales de la bioenergética es el que cierran el ortofos-

mismo ortofosfato disocia al energetizarse a metafosfato ( $\sim PO_3^{-**}$ ).

Como corolario del acoplamiento energético entre los sistemas redox y metafosfato-ortofosfato a través del par intermediario catión acilio-anión carboxilato podemos constatar: 1) el fosfoglicerato se fosforila al aceptar del ATP el ión fosforilio, o metafosfato, y el difosfoglicerato resultante se defosfata, liberando el anión ortofosfato, que se diprotona, al reducirse a fosfogliceraldehído por el ión hidruro, y 2) el fosfogliceraldehído se fosfata al oxidarse por pérdida del ión hidruro y aceptar el anión ortofosfato, que se desprotona, y el bifosfoglicerato resultante se defosforila al transferir el ión fosforilio al ADP. También es obvio que la ecuación global de la fermentación alcohólica es engañosa en su forma convencional super-simplificada, ya que sugiere una mera oxidorreducción intramolecular del azúcar, acoplada con la energetización del ortofosfato y su concomitante deshidratación:

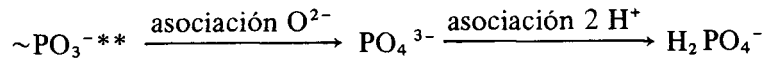
fato al energetizarse a metafosfato y éste al desenergetizarse a aquél. El ortofosfato ( $PO_4^{3-}$ ) exhibe una estructura estable tetraédrica, con cuatro enlaces  $\sigma$  entre el átomo de fósforo (hibridación  $sp^3$ ) y los cuatro átomos de oxígeno, y uno  $\pi$  enlazante deslocalizado entre un orbital  $d$  del fósforo y cuatro orbitales  $p$  de cada uno de los átomos de oxígeno. El ortofosfato presenta tres  $pK_a$  de muy distinto valor (2,1, 7,2 y 12,7): uno muy ácido, otro muy básico y el tercero, más o menos neutro, razón por la que, a pH fisiológico, muestra protonado el grupo de alto  $pK_a$  y más o menos protonado el intermedio, es decir, su fórmula es, aproximadamente,  $H_2PO_4^-$ . Por esta razón, el ortofosfato se comporta como una base muy débil cuando cede un anión óxido a un catión acilio y se energetiza a metafosfato [ $H_2PO_3^+$ ] $^{**}$ , convirtiéndose así en un ácido mucho más fuerte —de  $pK_a$  mucho más bajo— que, en consecuencia, disocia sus protones, según indica la siguiente secuencia de reacciones:



Como hemos mencionado en el apartado anterior, cuando el metafosfato se ancla en el ADP formando ATP sus dos  $pK_a$  son 4,1 y 6,9.

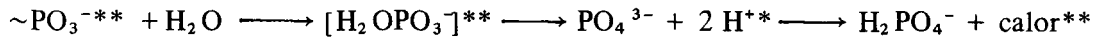
El metafosfato ( $\sim\text{PO}_3^{-**}$ ) es, en contraste con el ortofosfato, una estructura bipiramidal trigonal muy inestable, con tres enlaces  $\sigma$  entre el átomo de fósforo (hibridación  $sp^3d$ ) y los tres átomos de oxígeno. De hecho, el metafosfato es un "zwitterion"

( $\sim^+\text{PO}_3^{2-**}$ ;  $\sim^2+\text{PO}_3^{3-**}$ ), o ion fosforilio, más bien que un simple anión ( $\sim\text{PO}_3^{-**}$ ), y se comporta como un ácido fuerte cuando, como fosfocación, remueve un anión óxido de un anión carboxilato, desenergetizándose a ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) y convirtiéndose así en una base mucho más fuerte —de  $pK_a$  mucho más alto— que asocia dos protones, según indica la secuencia de reacciones:



Cuando el metafosfato fija agua se neutraliza a sí mismo en una reacción intramolecular ácido-base, liberando energía como calor, pero sin disociación aparente

de protones, ya que se comporta como un ácido fuerte que, al desenergetizarse, se convierte en una base fuerte, según la secuencia de reacciones:



Teniendo en cuenta las anteriores consideraciones se puede formular un ciclo muy simple de energetización y desenergetización del fosfato (Fig. 8): el ortofosfato se energetiza por remoción de un anión óxido y, como consecuencia, disocia sus

dos protones, pasando a metafosfato. El metafosfato se desenergetiza por asociación de un anión óxido y, como consecuencia, asocia a continuación dos protones, pasando a ortofosfato.

Analizados de este modo los hechos podemos afirmar que la molécula de ortofosfato es, en cierto modo, "vectorial" en el espacio y "secuencial" en el tiempo, en el sentido de que disocia primero, hacia un lado, un anión óxido y después, hacia el otro, sus dos protones. Análogamente, podemos también decir que la molécula de metafosfato se comporta con parecidas características, en el sentido de que asocia primero, por un lado, un anión óxido y después, por el otro, dos protones. Estas sencillas conclusiones —así como el hecho de que tanto el catión acilio y el anión ortofosfato, como el anión carboxilato y el "zwitterion" metafosfato, se transfieran uno a otro su energía electrónica a la par que intercambian un anión óxido— pueden ser esenciales para aclarar ciertos confusionismos y explicar el mecanismo de acción de las hasta ahora llamadas ATPasas translocadoras de protones y ATP

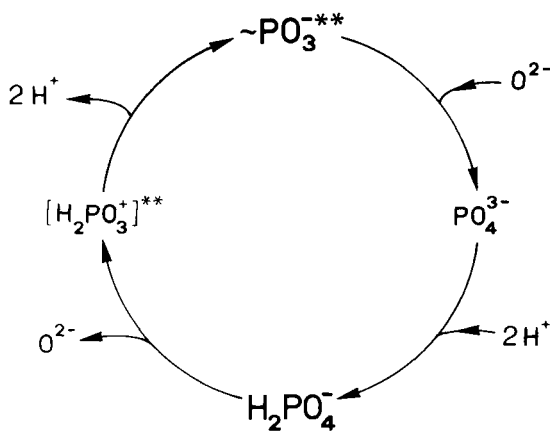


Fig. 8: El ciclo ortofosfato-metafosfato en bioenergética. El anión ortofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) se energetiza por la remoción de un anión óxido ( $\text{O}^{2-}$ ) a metafosfato  $[\text{H}_2\text{PO}_3^+]^{**}$ , que disocia sus dos protones ( $2 \text{H}^+$ ). El "zwitterion" metafosfato ( $\sim\text{PO}_3^{-**}$ ) se desenergetiza por la fijación de un anión óxido ( $\text{O}^{2-}$ ) a ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), que asocia dos protones ( $2 \text{H}^+$ ).

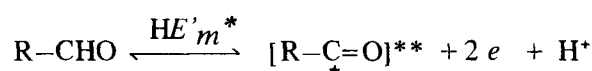
sintasas, conforme discutiremos en los correspondientes apartados.

*El sistema intermediario de acoplamiento energético catión acilio-anión carboxilato*

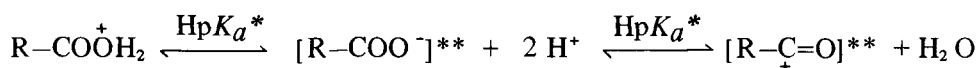
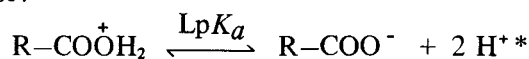
Antes de que los fotones entraran en juego y aparecieran los organismos fotoergónicos sobre la faz de la Tierra, las células sabían, obviamente, cómo tratar con la energización y desenergización de electrones, protones y ortofosfato y metafosfato, siendo la conversión reversible de los aniones carboxilato ( $R-COO^-$ ) en cationes acilio [ $R-\overset{+}{C}=O$ ]\*\* uno de los primeros y geniales descubrimientos de la bioener-

gética (Losada, 1978, 1979a, 1986; Losada *et al.*, 1983). En efecto, estas dos formas —desenergizada la una, y doblemente energizada y anhidra la otra, respectivamente— son, aparentemente, compartidas por tres de los sistemas transductores fundamentales de la bioenergética, a través de sus formas dirreducida aldehídica ( $R-CHO$ ), diprotonada ácida ( $R-COOH_2^+$ ) y monofosforilada ( $R-COO(P)$ ), ya que dichos sistemas pueden actuar, alternativamente, a dos potenciales redox estándar (bajo,  $LE'm'$  y alto,  $HE'm^*$ ), a dos  $pK_a$  (bajo,  $LpK_a$  y alto,  $HpK_a^*$ ), o a dos potenciales de transferencia de fosfato (alto,  $HPTP$ , y bajo,  $LPTP^*$ ), respectivamente, de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

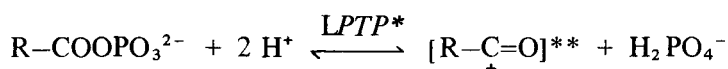
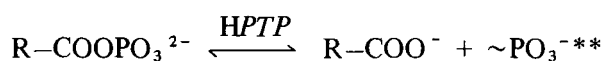
Sistema redox:



Sistema ácido-base:



Sistema metafosfato-ortofosfato:



Anteriormente hemos discutido con bastante detalle cómo el "zwitterion" metafosfato energiza al anión carboxilato y, viceversa, cómo el catión acilio energiza al anión ortofosfato. Por otro lado, no hace falta insistir en que el mecanismo molecular del acoplamiento energético entre los sistemas de transducción redox y metafosfato-ortofosfato —que, como es bien sabido, operan en glicólisis, gluconeogénesis, ciclos disimilatorio (ácidos tricarbónicos) y asimilatorio (ribulosa-bisfosfato y ácidos tricarbónicos) del carbono— es uno de los ejemplos mejor conocidos y

más ilustrativos de la bioenergética desde los albores de la moderna bioquímica (Lipmann, 1941; Calvin y Bassham, 1962; Warburg, 1964; Lynen, 1976; Racker, 1976; Arnon, 1977; Ochoa, 1980; Krebs, 1981). En cambio, el mecanismo de acoplamiento entre los sistemas de transducción de energía metafosfato-ortofosfato y ácido-base de la ATPasa de la membrana plasmática (Poole, 1978; Villalobo *et al.*, 1981; Carafoli y Scarpa, 1982; Serrano, 1984; Scarborough, 1985), que permite la creación de un gradiente electroquímico de protones, aparentemente por transloca-

ción de protones, y, viceversa, entre los sistemas ácido-base y metafosfato-ortofosfato de las ATP sintasas respiratorias y fotosintéticas (Boyer *et al.*, 1977; Carafoli y Scarpa, 1982; Amzel y Pedersen, 1983; Futai y Kanazawa, 1983; Senior y Wise, 1983; Wang, 1983; Slater *et al.*, 1985), enzimas que aparentemente también translocan protones, permanece oculto como un gran enigma. Igual podemos decir respecto a la piridín nucleótido transhidrogenasa ligada a membrana, que permite el acoplamiento energético entre los sistemas ácido-base y redox (Boyer *et al.*, 1977; Fisher y Earle, 1982), y que como las anteriores translocasas de protones se inhibe por la dicitlohexilcarbodiimida, DCCD (Solioz, 1984).

Nosotros creemos (Losada, 1978, 1979a, 1985; Losada *et al.*, 1983) que el par de dos electrones o dos protones catión acilio-anión carboxilato puede actuar como sistema transductor intermediario, permitiendo no sólo el acoplamiento de las energías redox y metafosfato-ortofosfato, sino el de cualesquiera de las otras formas de energía apareadamente, es decir, metafosfato-ortofosfato y ácido-base o viceversa, y ácido-base y redox o viceversa.

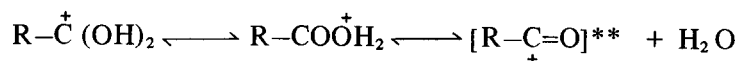
En efecto, el anión carboxilato es una estructura estable en la que el átomo de

carbono se une en configuración trigonal (hibridación  $sp^2$ ) por un enlace  $\sigma$  a cada uno de los dos átomos de oxígeno. Además, el orbital  $p$  del carbono y uno  $p$  de cada oxígeno dan lugar a la formación de tres orbitales moleculares  $\pi$ : uno enlazante (lleno), otro no enlazante (lleno), y un tercero antienlazante (vacío). La primera protonación a bajo pH de la forma estable del anión carboxilato promueve su energetización parcial al convertir el orbital  $\pi$  enlazante deslocalizado entre los tres átomos en un orbital  $\pi$  enlazante (lleno) localizado entre el carbono y un oxígeno y, a la par, desplazar el orbital  $\pi$  no enlazante hacia el otro átomo de oxígeno, que sufrió la protonación y donde aparece como orbital  $p$  (lleno). Una segunda protonación a pH todavía más bajo promueve la energetización definitiva del anión carboxilato al convertir el orbital  $\pi$  enlazante, localizado entre el carbono y un oxígeno, en un orbital  $p$  (lleno) de éste y dejar vacío el recién formado orbital  $p$  del carbono, tal como representa el esquema de la Figura 9 y resumen las siguientes ecuaciones, correspondientes a las formas no protonadas del anión carboxilato en su estado basal y en sus dos estados de energetización electrónica parcial o completa:



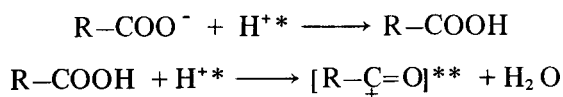
Como antes hemos mencionado, la forma diprotonada doblemente energetizada del anión carboxilato está, en principio, ener-

géticamente en equilibrio con su forma anhidra, o catión acilio:



Respecto a la energetización por doble protonación a bajos pH del anión carboxilato a catión acilio, con remoción de un anión óxido como molécula de agua, interesa recordar aquí su similitud con el proceso de conversión del anión carbonato en dióxido de carbono. Es más, como en este caso —recuérdese el mecanismo, dependiente de  $Zn^{2+}$ , de la enzima anhidrasa carbónica (Lindskog *et al.*, 1971)—, el proceso puede implicar —más que una

doble protonación consecutiva del anión, con un segundo  $pK_a$  demasiado bajo—, una primera protonación a ácido monocarboxílico, seguida de la remoción por un segundo protón —a un  $pK_a$  ya menos bajo— de un anión hidróxido, según las siguientes ecuaciones:



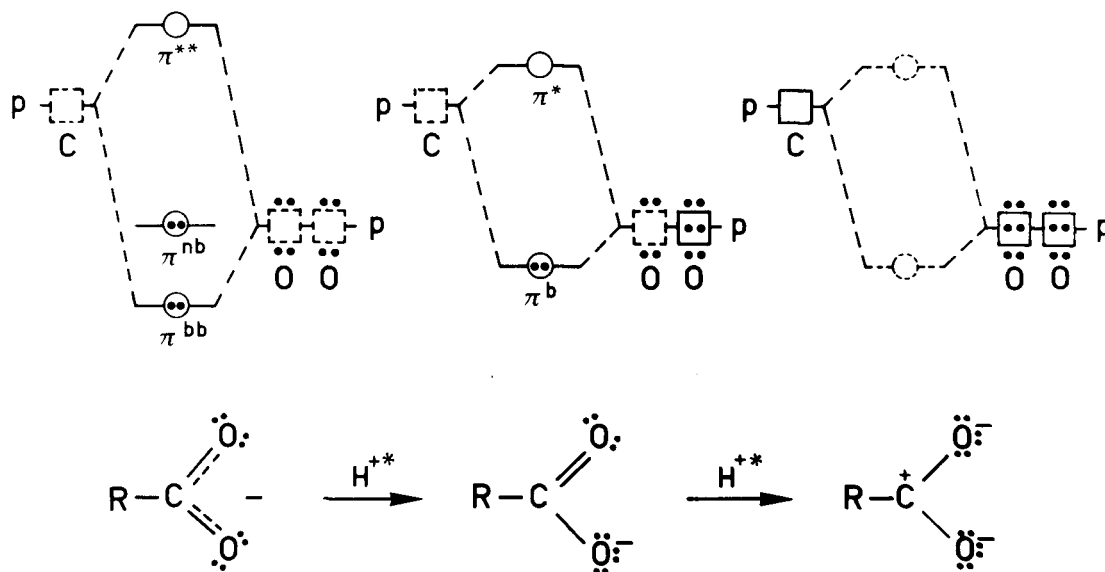


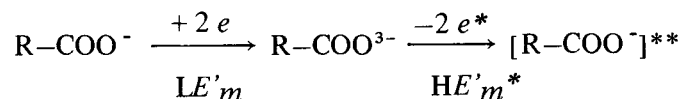
Fig. 9: Esquema de la energización electrónica del anión carboxilato por doble protonación. El anión carboxilato estable ( $R-COO^-$ ) se energiza parcialmente  $[R-COO^-]^*$  por una primera protonación ( $H^{+*}$ ), al convertirse el orbital  $\pi^{bb}$  enlazante deslocalizado entre los tres átomos en el orbital  $\pi^b$  enlazante localizado entre el átomo de carbono y uno de los átomos de oxígeno, a la par que el orbital  $\pi^{nb}$  no enlazante se desplaza, como orbital  $p$ , al otro átomo de oxígeno, que previamente sufrió la protonación. A continuación, el anión carboxilato energizado una vez se energiza de nuevo definitivamente  $[R-COO^-]**$  por una segunda protonación ( $H^{+*}$ ), al convertirse el orbital  $\pi^b$  enlazante localizado entre el átomo de carbono y un átomo de oxígeno en un orbital  $p$  lleno de éste y dejar vacío el del carbono. Para simplificar, sólo se han representado las formas no protonadas del anión carboxilato en su estado basal y en sus estados una vez y dos veces energizado resultantes de la primera y segunda protonación.

A este respecto interesa llamar la atención sobre la pretensión por algunos autores de que la ATP sintasa contiene un átomo de Zn por molécula (Sun y Crane, 1975; Mollinedo *et al.*, 1981).

La conversión —por reducción a bajo potencial seguida de oxidación a alto potencial— de la forma estable del anión carboxilato en su forma inestable doblemente energizada se representa esquemáticamente en la Figura 10. Interesa especialmente destacar que la reducción a bajo potencial implica la entrada de dos electrones en el orbital  $\pi$  antienlazante existente entre el átomo de carbono y los dos átomos de oxígeno del anión carboxi-

lato, y que la forma reducida resultante, con los tres orbitales  $\pi$  llenos, se dismuta reversiblemente en otra equivalente, en el sentido de que los tres orbitales  $\pi$  se transforman en tres orbitales  $p$  de cada uno de los tres átomos citados, que aparecen entonces igualmente llenos.

También interesa destacar que la subsiguiente oxidación a alto potencial de la forma reducida aldehídica implica la remoción de los dos electrones del orbital  $p$  del carbono y conduce directamente a la formación de la forma oxidada doblemente energizada del anión carboxilato, según indican las siguientes ecuaciones de oxidorreducción a bajo y alto potencial:



El par catión acilio-anión carboxilato parece, pues, en principio, capaz de actuar

(Fig. 11) como sistema intermediario de acoplamiento en la transducción pareada

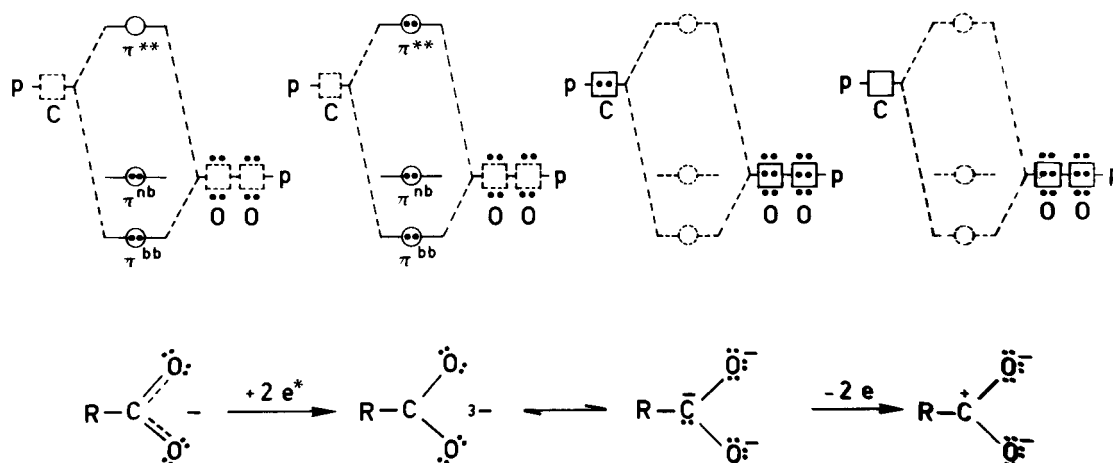


Fig. 10: Esquema de la energización electrónica del anión carboxilato por reducción y oxidación a bajo y alto potencial, respectivamente. En primer lugar, el anión carboxilato estable ( $R-COO^-$ ) se reduce a bajo potencial por la entrada de dos electrones ( $2 e^*$ ) en el orbital  $\pi^{**}$  antienlazante vacío que forman el átomo de carbono y los dos de oxígeno ( $R-COO^{3-}$ ). Seguidamente, la forma reducida resultante se dismuta en otra energéticamente equivalente al convertirse los tres orbitales  $\pi$  llenos en sendos orbitales  $p$  ( $R-\dot{C}OO^-$ ). Por último, el carbanión de la forma reducida aldehídica cede sus dos electrones a alto potencial ( $2 e$ ) y da lugar, directamente, a la forma doblemente energizada del anión carboxilato [ $R-C\ddot{O}O^-$ ].

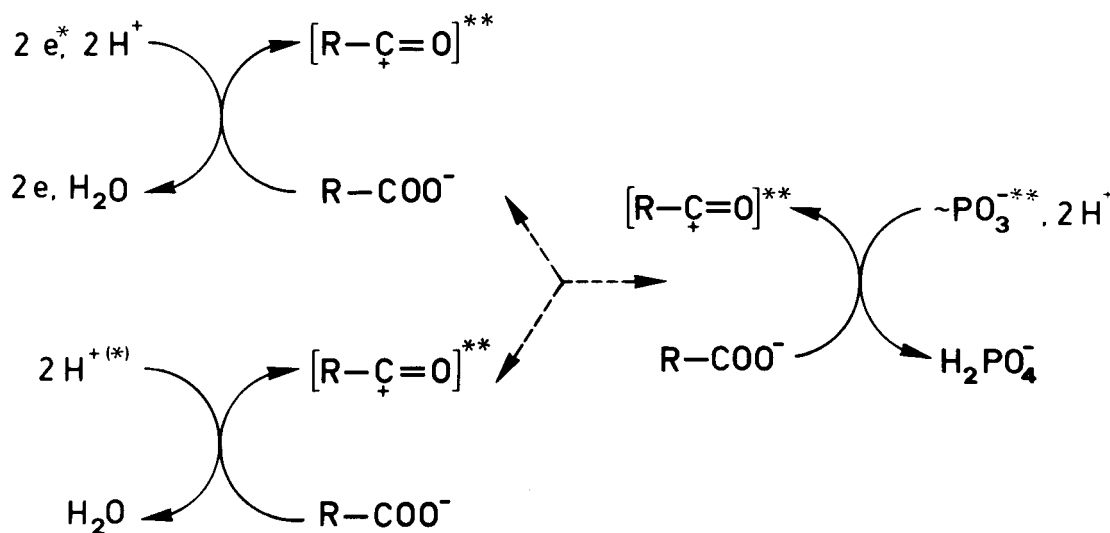


Fig. 11: Acoplamiento entre las energías redox, ácido-base y metafosfato-ortofosfato mediante el par catión acilio-anión carboxilato. La energización del anión carboxilato ( $R-COO^-$ ) a catión acilio [ $R-C\ddot{O}O^-$ ] se puede conseguir: 1) por la acción directa de dos protones ricos en energía ( $2 H^{+*}$ ), con eliminación de agua ( $H_2O$ ); 2) por la caída de potencial de dos electrones ( $2 e^* \rightarrow 2 e$ ), con el concurso de dos protones ( $2 H^+$ ) y la consiguiente eliminación de agua ( $H_2O$ ); 3) por la desenergización del metafosfato ( $\sim PO_3^{***}$ ) a ortofosfato ( $PO_4^{3-}$ ) y fijación de dos protones ( $2 H^+$ ), lo que resulta en la hidratación del metafosfato ( $H_2PO_4^-$ ).

de las tres formas de energía (redox, ácido-base y metafosfato-ortofosfato) que se discuten a continuación:

*ATPasas y ATP sintasas generadoras y consumidoras, respectivamente, de un gradiente electroquímico de protones*

La Figura 12 muestra esquemáticamente

el probable mecanismo de acoplamiento entre los sistemas de transducción de energía metafosfato-ortofosfato y ácido-base (Losada *et al.*, 1983; Losada, 1985) de la llamada ATPasa translocadora de protones de la membrana plasmática (Poole, 1978; Goffeau and Slayman, 1981; Serrano, 1984; Scarborough, 1985). El mecanismo

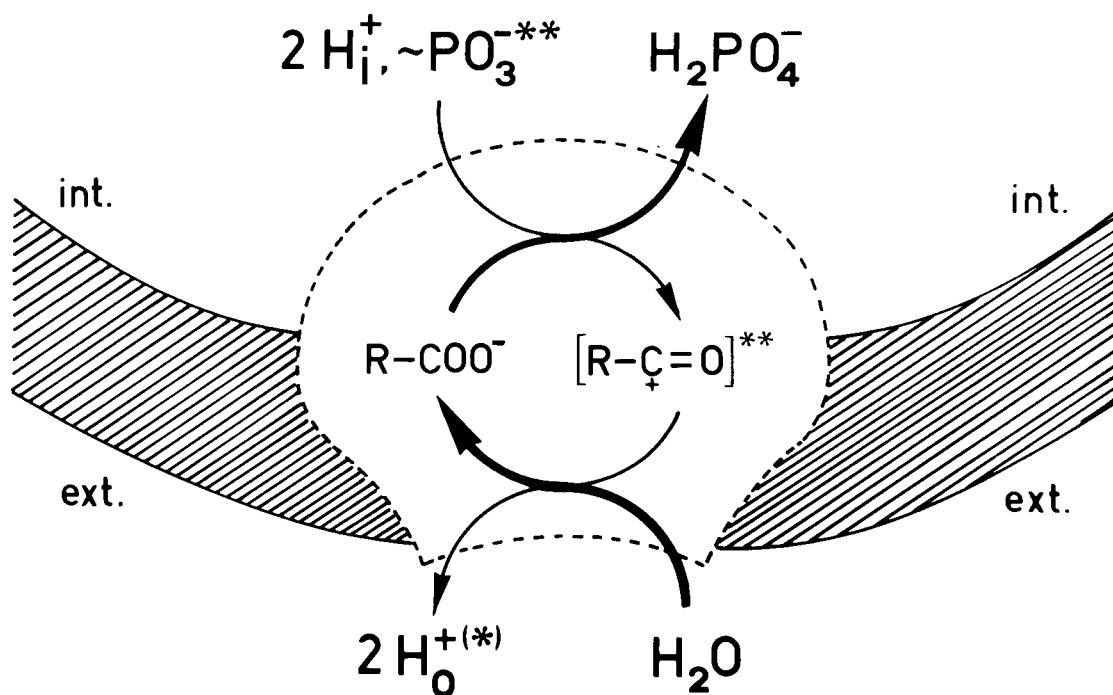
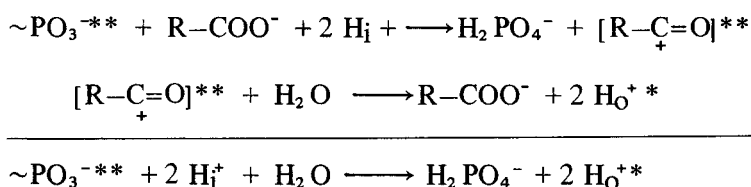


Fig. 12: Esquema de la transducción de energía metafosfato-ortofosfato en energía ácido-base por la ATPasa de la membrana plasmática. El metafosfato ( $\sim\text{PO}_3^{-**}$ ), actuando como fosforilación, remueve un anión óxido ( $\text{O}^{2-}$ ) de un grupo anión carboxilato ( $\text{R}-\text{COO}^-$ ) de la enzima y se desenergiza a ortofosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), que fija, a alto pH, dos protones ( $2 \text{H}_i^+$ ) del citosol ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ). El catión acilio  $[\text{R}-\overset{+}{\text{C}}=\text{O}]^{**}$  resultante de la energización de anión carboxilato por el metafosfato se desenergiza, a su vez, cerrando el ciclo de la enzima, al remover un anión óxido ( $\text{O}^{2-}$ ) del agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ), que disocia, a bajo pH, sus dos protones ( $2 \text{H}_o^{+*}$ ) al medio exterior. La ATPasa transloca, pues, aniones óxido del agua del medio (*ext.*) al metafosfato del citosol (*int.*), a la par que libera protones a bajo pH en el exterior y promueve la fijación por el ortofosfato de protones a alto pH en el interior.

propuesto se basa en que la enzima —constituida por una sola cadena polipeptídica de hacia 100 kDa— posee un grupo carboxilato de un residuo de aspartato sensible a

la DCCD, por el que se une al metafosfato del ATP formando una fosfoenzima. La secuencia de reacciones propuesta es la siguiente:



El hecho paradójico es que, de acuerdo con esta interpretación, la enzima es más bien translocadora de aniones óxido del exterior de la célula al interior —a través del par catión acilio-anión carboxilato— que translocadora de protones en sentido inverso.

La ATP sintasa de la membrana tilacoidal es, en principio, similar no sólo a la ATP sintasa de la membrana interna mitocondrial sino a la de la membrana plasmá-

tica de las bacterias, por lo que no deben diferir fundamentalmente entre sí en sus mecanismos de acoplamiento energético, que —como en el caso de la ATPasa de la membrana plasmática— parecen implicar más bien la translocación de aniones óxido en un sentido que la de protones en el opuesto.

La Figura 13 muestra esquemáticamente el probable mecanismo de acoplamiento



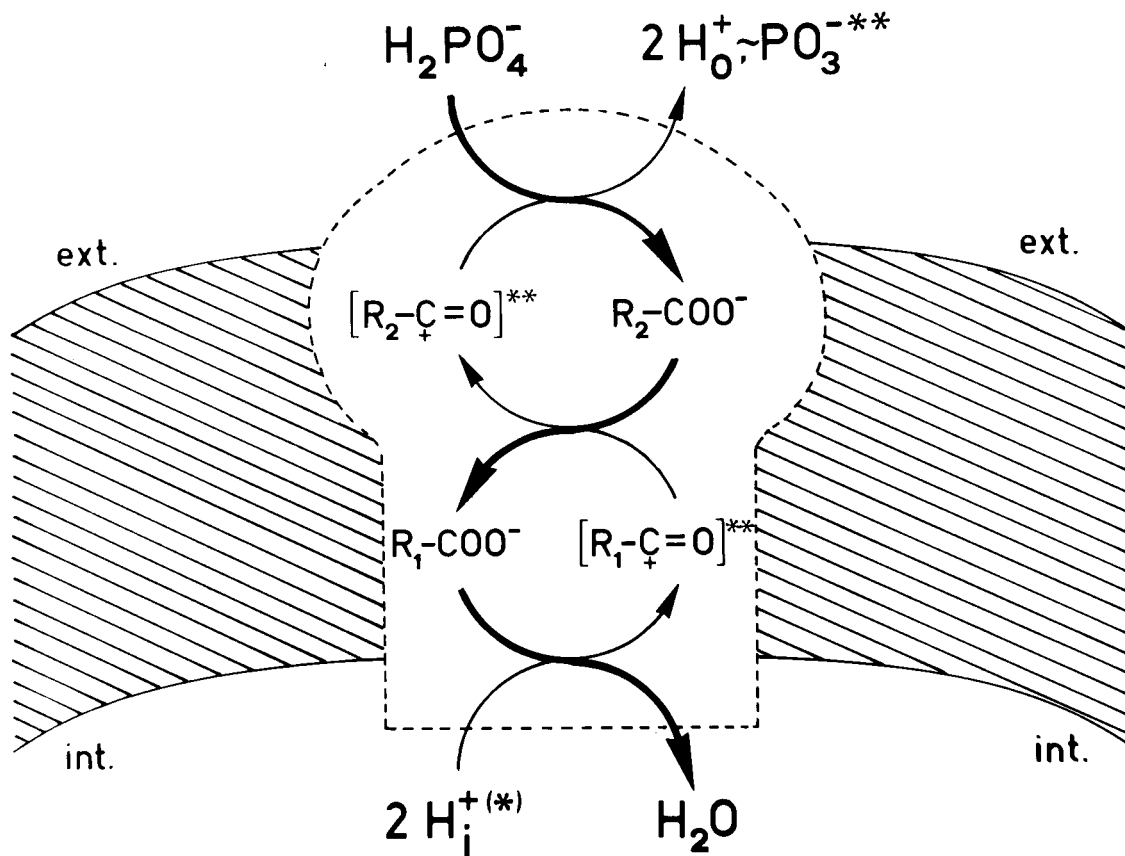
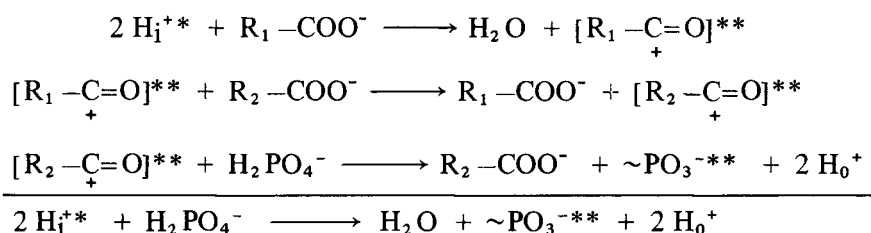


Fig. 13: Esquema de la transducción de energía ácido-base en energía metafosfato-ortofosfato por la ATP sintasa tilacoidal. Un primer grupo anión carboxilato ( $R_1\text{-COO}^-$ ) de la enzima se energetiza a catión acilio  $[R_1\text{-C=O}]^{**}$  por remoción, como  $\text{H}_2\text{O}$ , de un anión óxido ( $\text{O}^{2-}$ ) por dos protones ricos en energía ( $2 \text{H}_1^{+*}$ ) del medio intratilacoidal. El proceso se repite, energetizándose un segundo grupo anión carboxilato ( $R_2\text{-COO}^-$ ) a catión acilio  $[R_2\text{-C=O}]^{**}$  al transferir un anión óxido ( $\text{O}^{2-}$ ) al primero en la secuencia, previamente energetizado como se ha dicho. Finalmente, el ortofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) se energetiza a metafosfato ( $\sim\text{PO}_3^{-**}$ ) al ceder un anión óxido ( $\text{O}^{2-}$ ) al segundo catión acilio y disociar dos protones en el estroma a alto pH ( $2 \text{H}_0^+$ ). La energetización del ortofosfato es concomitante con la desenergetización del segundo catión acilio a anión carboxilato y renueva a su estado inicial a la enzima, cuya función es, pues, la de translocar aniones óxido del espacio extratilacoidal (*ext.*) al intratilacoidal (*int.*) más bien que protones en sentido inverso.

entre los sistemas de transducción de energía ácido-base y metafosfato-ortofosfato (Losada *et al.*, 1983; Losada, 1985) de la llamada ATP sintasa translocadora de protones de las membranas fotosintéticas y respiratorias (Boyer *et al.*, 1977; Carafoli y Scarpa, 1982; Amzel y Pedersen, 1983; Futai y Kanazawa, 1983; Senior y Wise, 1983; Wang, 1983; Slater *et al.*, 1985). Las ATP sintasas, en general, son enzimas mucho más grandes (hacia 10 nm y 500 kDa) y complejos que la ATPasa de la membrana plasmática y aparecen constituidas por dos mitades separables, a saber, una peduncular hidrofóbica ( $F_0$ )

que mira hacia el espacio intratilacoidal o extramitacoidal, en su caso, y otra mitad hidrofílica globular ( $F_1$ ) —a su vez constituida por cinco tipos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) de subunidades polipeptídicas— que mira hacia el estroma del cloroplasto o a la matriz mitocondrial y convierte el ortofosfato en metafosfato, uniéndolo al ADP. En el contexto de este trabajo, uno de los aspectos más interesantes a destacar es que el inhibidor DCCD actúa a dos niveles de la enzima, es decir, sobre la mitad  $F_0$  y sobre la subunidad  $\beta$  de la mitad  $F_1$ . Por ello —y aunque hasta la fecha no se haya aislado la posible escurridiza fosfoenzima—

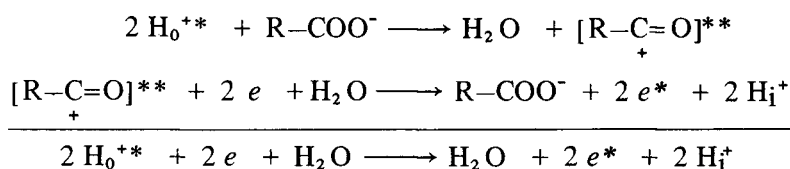
el mecanismo de acoplamiento propuesto para la ATP sintasa es similar —si bien en dirección contraria— al que parece operar en el caso de la ATPasa de la membrana plasmática, según la siguiente secuencia de reacciones para la enzima tilacoidal:



*Piridín nucleótido transhidrogenasa impulsada por un gradiente electroquímico de protones*

En principio, y puesto que esta enzima de hacia 100 kDa (Boyer *et al.*, 1977; Fisher y Earle, 1982) no sólo se inhibe por DCCD sino que la transhidrogenación está acoplada con el flujo de protones a través de la

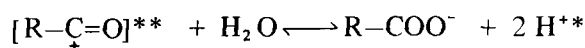
membrana interna de las mitocondrias, el mecanismo de acoplamiento entre la energía ácido-base y redox debe también ocurrir —como en los casos de la ATPasa y ATP sintasas antes descritos— a través del par catión acilio-anión carboxilato, según el esquema de la Figura 14 y de acuerdo con la siguiente secuencia de reacciones:



Puesto que el nivel de NADPH en las mitocondrias es considerablemente más alto que el de NADH debe concluirse —teniendo en cuenta que los potenciales redox medios de ambos dinucleótidos son esencialmente idénticos— que el sistema enzimático implicado en la reacción redox dependiente de NAD utiliza la forma del anión carboxilato energizada por los protones extramitocondriales, o catión acilio, en tanto que el sistema dependiente de NADP utiliza la forma estable del anión en equilibrio con los protones de la matriz mitocondrial. Recuérdese que las células fotosintéticas poseen una triosa-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP que reduce el dinucleótido sin producir ATP, es decir, a bajo potencial. De acuerdo con el mecanismo propuesto (Losada, 1985), la transhidrogenasa ligada a membrana es también translocadora de aniones óxido más bien que de protones, fijando

estos últimos, como agua, en el citosol y liberándolos, también del agua, pero a más alto pH, en la matriz mitocondrial, a la par que transfiere electrones contra gradiente del NADH al NADP<sup>+</sup>. Las bacterias poseen también transhidrogenasas ligadas a membrana similares a las de las mitocondrias.

El mecanismo de transducción de energía propuesto para la transhidrogenasa pone de manifiesto que el catión acilio puede desenergetizarse, en principio, reversiblemente a anión carboxilato o bien por energización del agua y disociación de sus dos protones a bajo pH:



o bien por reducción a alto potencial seguida de oxidación a bajo potencial, secuencia de reacciones que conlleva igual-

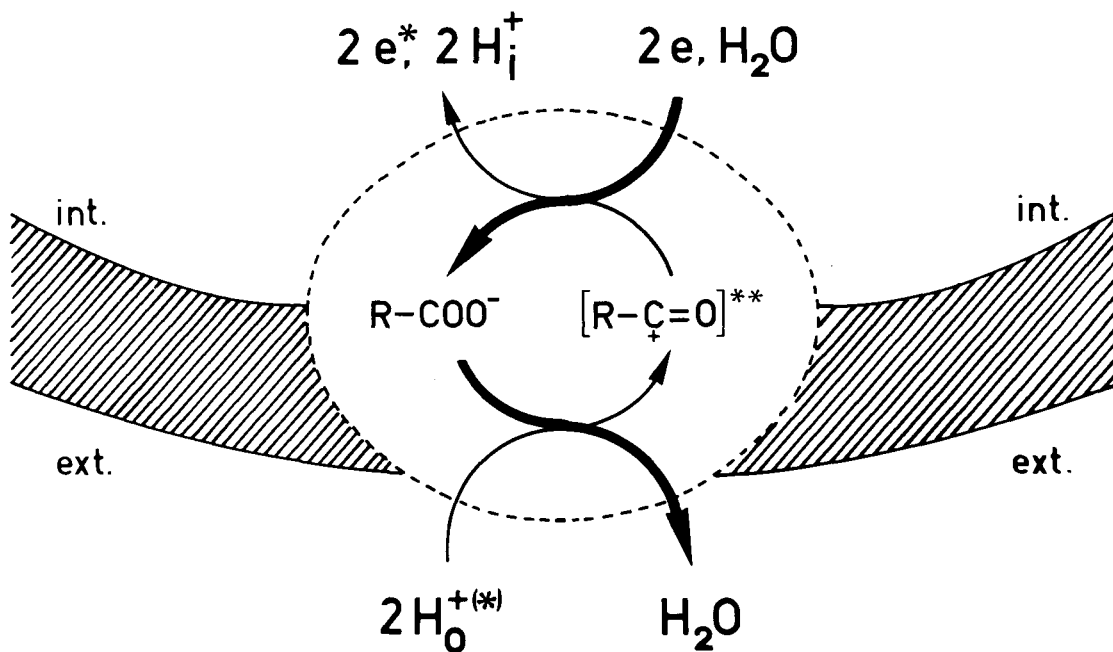
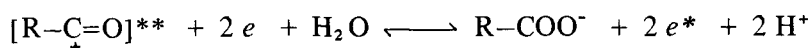


Fig. 14: Esquema de la transducción de energía ácido-base en energía redox por la piridín nucleótido transhidrogenasa ligada a membrana. Un grupo anión carboxilato (R-COO<sup>-</sup>) de la enzima se energiza primero a catión acilio [R-C=O]<sup>+</sup>\*\* por remoción de un anión óxido (O<sup>2-</sup>), como agua (H<sub>2</sub>O), por dos protones ricos en energía (2 H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>\*) del espacio extramitocondrial. El catión acilio se reduce después a alto potencial aceptando, como ion hidruro, dos electrones (2 e) del NADH y se oxida, a continuación, a bajo potencial (2 e\*) cediéndolos al NADP<sup>+</sup>, a la par que, con el concurso del agua (H<sub>2</sub>O), se desenergiza a la forma inicial de anión carboxilato y disocia dos protones a alto pH (2 H<sub>1</sub><sup>+</sup>) en la matriz mitocondrial. La transhidrogenasa transloca, pues, un anión óxido de una molécula de agua del espacio intramitocondrial (int.) al extramitocondrial (ext.), disociando protones a alto pH, por un lado, y fijándolos, de nuevo, como agua, a bajo pH, por el otro. El proceso exergónico ácido-base se acopla mediante el par catión acilio-anión carboxilato con el proceso redox endergónico.

mente la remoción por el catión acilio de sus dos protones, si bien obviamente a del anión óxido del agua y la disociación más alto pH:



Dando por descontado que todas las reacciones descritas de reducción de aniones carboxilato o cationes acilio a grupos aldehído, o viceversa, implican aniones hidruro, hemos considerado, sin embargo, conveniente —para poner más claramente de manifiesto sus mecanismos— utilizar en los esquemas, así como en las ecuaciones, pares de electrones y pares de protones a diferentes niveles de energía.

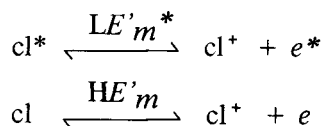
*Fotosistemas redox y ácido-base de un electrón y un protón*

El gran descubrimiento de la fotosíntesis fue ciertamente la introducción en el

metabolismo celular de fotosistemas redox de un electrón (clorofila a de los centros de reacción de las membranas tilacoidales) y fotosistemas ácido-base de un protón (bacteriorrodopsina de las membranas de halobacterias).

La clorofila a es, sin duda, el fotosistema redox transductor más importante y universal de la biología. Este fotosistema presenta como característica funcional fundamental (Losada, 1978, 1979ab, 1985; Losada y Guerrero, 1979; Losada et al., 1983) la de estar constituido por dos pares redox de un electrón operantes a distinto potencial según el estado de energización de la forma reducida, que al absorber en su estado basal (cl) un

cuanto de luz se excita electrónicamente ( $cl^*$ ). Ambos pares comparten, por lo demás, la misma forma oxidada ( $cl^+$ ). El fotosistema redox clorofila *a* pertenece, por tanto, al tipo de forma reducida energizada. Esta capacidad de operar alternativamente a dos potenciales redox medios permite a la clorofila *a* de los centros de reacción transducir la energía luminosa en energía redox, aceptando a alto potencial ( $HE'_m$ ) electrones pobres en energía ( $e$ ) de donadores adecuados (en último término del agua), y cediendo a bajo potencial ( $LE'_m^*$ ) electrones ricos en energía ( $e^*$ ) a aceptores apropiados (en último término, a los bioelementos primordiales oxidados), tal como muestra el esquema de la Figura 15 y de acuerdo con los siguientes equilibrios:



La transferencia contra gradiente de los electrones del agua a los bioelementos oxidados requiere dos fotones por electrón y la participación en serie de la clorofila *a* de los centros de reacción de los fotosistemas II y I. En consecuencia, ocho fotones visibles, o sea, hacia 16 eV, son necesarios para la biofotólisis de dos moléculas de agua, proceso que conlleva no sólo la transferencia de cuatro electrones a los bioelementos (hacia 5 eV) sino la liberación y fijación de cuatro protones en los espacios intratilacoidal y extratilacoidal, respectivamente. Otro hecho adicional importante es que la transferencia de electrones desde el agua a los bioelementos incluye un tra-

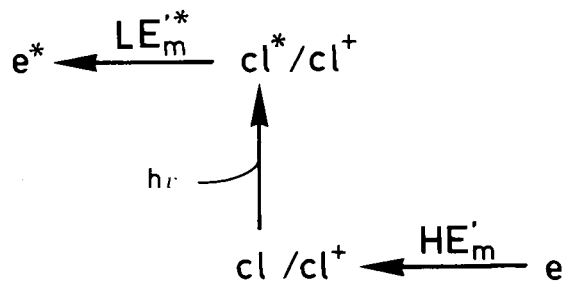
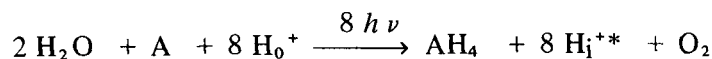


Fig. 15: Transducción de energía luminosa en energía electrónica y subsiguientemente en energía redox por la clorofila *a*. En su estado basal, el pigmento puede operar a alto potencial ( $HE'_m$ ) aceptando electrones ( $e$ ) su forma oxidada ( $cl^+$ ) de donadores apropiados. A continuación, después de la excitación de su forma reducida ( $cl$ ) por la absorción de un cuanto de luz ( $h\nu$ ), el pigmento puede operar a bajo potencial ( $LE'_m^*$ ) cediendo electrones ( $e^*$ ) su forma reducida energizada ( $cl^*$ ) a aceptores adecuados. De esta manera, la clorofila puede impulsar la transferencia de electrones contra gradiente a expensas de energía luminosa. Obsérvese que ambos pares redox comparten la misma forma oxidada y difieren sólo en el estado de energización electrónica de la forma reducida.

mo cuesta abajo de hacia 0,4 V, concretamente entre el lado reductor del PS II (plastoquinona) y el lado oxidante del PS I (plastocianina), que, con un inefable sentido de eficiencia biológica, se acopla, a su vez, con la translocación de un protón por electrón desde el espacio extratilacoidal al intratilacoidal. En conjunto, pues, por cada cuatro electrones que se transfieren desde el agua a los bioelementos aparecen ocho protones en el medio interno a la par que un número idéntico de protones es removido del estroma (Arnon, 1977; Losada y Guerrero, 1979; Metzner, 1981; Govindjee, 1982; Losada *et al.*, 1983; Losada, 1985). Se origina así (ver Fig. 3) un gradiente electroquímico de protones de hacia 2 eV según resume la ecuación global:

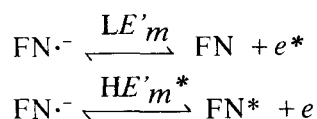


El rendimiento máximo teórico del proceso fotosintético de transducción de la energía luminosa en energía redox y, subsiguientemente, en energía ácido-base, es, por tanto, de hacia el 44%.

Las flavinas (Singer, 1976) representan otro fotosistema de extraordinaria importancia en biología para la conversión de la energía luminosa en energía redox (Lo-

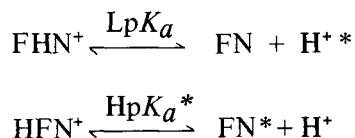
sada, 1978, 1979ab, 1985; Losada *et al.*, 1983), ya que sus formas oxidadas amarillentas (FN) se excitan al absorber un cuanto de luz (FN\*). El fotosistema flavínico presenta, pues, como característica funcional fundamental la de estar constituido por dos pares redox de un electrón que —en contraste con los pares del fotosistema de clorofila *a*— operan a distinto po-

tencial según el estado de energetización de la forma oxidada. Ambos pares comparten, por lo demás, la misma forma reducida semiquinónica (FN<sup>•-</sup>). Los fotosistemas flavínicos redox pertenecen, por tanto, al tipo de forma oxidada energetizada y pueden, con el mismo resultado neto que la clorofila, transducir la energía luminosa en energía redox aceptando electrones pobres en energía a alto potencial (HE'<sub>m</sub><sup>\*</sup>) de donadores adecuados y cediendo electrones ricos en energía a bajo potencial (LE'<sub>m</sub>) a aceptores apropiados, de acuerdo con los siguientes equilibrios:

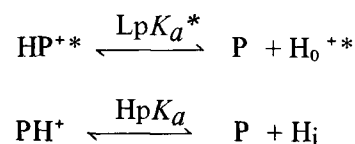


Los fotosistemas redox flavínicos representan interesantes modelos para la conversión de la energía solar en energía química, siendo, a este respecto, dignos de mención los procesos de fotoproducción de hidrógeno, agua oxigenada, amoníaco, etc., que son objeto de investigación en diferentes laboratorios, entre ellos en el nuestro (Candau *et al.*, 1980; De la Rosa *et al.*, 1983).

Las flavinas son, además, pigmentos muy peculiares porque no sólo pueden transducir la energía luminosa en energía redox sino también en energía ácido-base, perteneciendo, desde este punto de vista, al tipo de los fotosistemas de forma básica energetizada, en el sentido de que el par ácido-base aumenta su pK<sub>a</sub> al energetizarse su forma básica (Losada, 1979a; Losada *et al.*, 1983). En efecto, la forma básica (FN) presenta en su estado desenergetizado fundamental muy baja afinidad por los protones, con un pK<sub>a</sub> de hacia 0. En cambio, después de su energetización por la absorción de un cuanto de luz azul (FN<sup>\*</sup>), su pK<sub>a</sub> sube hasta 5. Ambos pares comparten, por lo demás, una forma ácida común, aunque no necesariamente protonada en el mismo grupo activo —es decir, por ejemplo, en una representación esquemática, FNH<sup>+</sup> y HFN<sup>+</sup> (véase siguiente apartado)—, de acuerdo con los equilibrios:



Otro fotosistema ácido-base de enorme interés es la bacteriorrodopsina de la membrana purpúrea de las halobacterias (Stoeckenius y Bogomolni, 1982). El grupo prostético del pigmento es el retinal, o forma aldehídica de la vitamina A, unido a un residuo de lisina de la cadena polipeptídica por una base de Schiff de muy alto pK<sub>a</sub>. Al iluminarse la bacteriorrodopsina, el pK<sub>a</sub> de su forma ácida disminuye de por encima de 10 a 3,5, permitiendo, además, la translocación del protón desde el interior de la célula al exterior, lo que conduce a la creación de un gradiente electroquímico de protones por un mecanismo probablemente muy similar al que utilizan otras bombas de protones, como las NADH-deshidrogenasas y los citocromos *b* transductores de las cadenas de transporte de electrones (véase próximo apartado). La estentorina, o pigmento receptor del ciliado fotofóbico verde-azulado *Stentor*, cuyo grupo cromóforo ha sido identificado como hipericina, es otro interesante ejemplo de fotosistema ácido-base del tipo de forma ácida energetizada (Walker *et al.*, 1979). En efecto, como consecuencia de la bajada de pK<sub>a</sub> del grupo cromóforo de 7,0 a 3,5 y de la concomitante translocación de protones, el pH del medio disminuye marcadamente al irradiar al ciliado en medio poco tamponado. Tanto la bacteriorrodopsina como la stentorina son pigmentos (P) pertenecientes a los fotosistemas ácido-base del tipo de forma ácida energetizada (Losada, 1979a, 1985; Losada *et al.*, 1983), que disminuyen su pK<sub>a</sub> al energetizarse la forma ácida del par al mismo tiempo que translocan el protón de grupo (PH<sup>+</sup> → HP<sup>\*\*</sup>) a través de su propia molécula, según las ecuaciones:



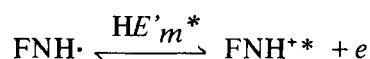
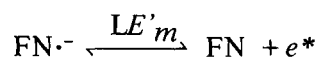
*Sistemas transductores de energía redox/ácido-base de un electrón y un protón de las cadenas de transporte*

Como ya hemos mencionado, la gran invención de las algas consistió en la introducción de la clorofila *a* como sistema transductor de un electrón de la energía luminosa en energía redox (Arnon, 1977; Losada, 1978, 1979ab; Losada y Guerrero, 1979; Metzner, 1981; Govindjee, 1982; Losada *et al.*, 1983). El pigmento P<sub>680</sub> del fotosistema II genera una diferencia de potencial contra gradiente de hacia 1 V, aproximadamente de +1 a 0 V, en tanto que el pigmento P<sub>700</sub> del fotosistema I genera una diferencia de potencial, también contra gradiente y de hacia 1 V, pero aproximadamente de +0,4 a -0,4 V. Por tanto, el salto de potencial entre el PS II y el PS I es de hacia +0,4 V a favor de gradiente.

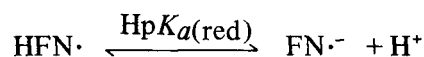
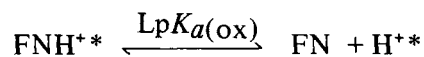
Teniendo en cuenta los nuevos potenciales introducidos por el fotosistema redox clorofila *a* de un electrón es obvio que la maquinaria enzimática previamente utilizada por las células anaeróbicas para la transducción directa de la energía redox en energía metafosfato-ortofosfato, a través del sistema de dos electrones catión acilio (hacia -0,3 V) -anión carboxilato (hacia -0,6 V), resultaba inaplicable a la nueva situación. Se necesitaba, pues, una solución adicional a la ya existente, a base de introducir nuevos sistemas transductores capaces de utilizar, en uno o dos saltos, la energía liberada en la caída de un electrón a través de los tramos de potencial especificados. La respuesta fue hallada, primeramente, en los citocromos *b*-563 y *b*-559 fotosintéticos, y, a renglón seguido -una vez entrado en juego en el metabolismo celular el oxígeno desprendido en la fotosíntesis- en la NADH-deshidrogenasa, el citocromo *b*-564 y la citocromo oxidasa de la cadena respiratoria, todos ellos eficientes talentos de la maquinaria energética celular que los bioenergetistas no han podido todavía desentrañar. Dadas las limitaciones de espacio, nos referiremos exclusivamente en este artículo a algunos aspectos de los citocromos *b* -especialmente estudiados en nuestro laboratorio

(De la Rosa *et al.*, 1981; Losada *et al.*, 1983; Hervás *et al.*, 1984, 1985)- y a la NADH-deshidrogenasa.

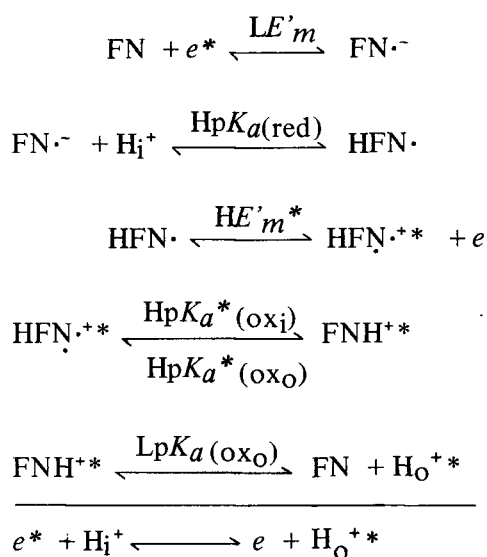
En el apartado anterior hemos tratado de los pigmentos flavínicos como fotosistemas redox o ácido-base de un electrón. Ahora debemos añadir que las flavinas se caracterizan, además, porque aumentan su potencial redox medio por protonación a bajo pH, según indican las siguientes ecuaciones:



Asimismo, las flavinas aumentan su  $pK_a$  por reducción a bajo potencial, de acuerdo con las siguientes ecuaciones:



Además, algunas flavoproteínas, tales como la dihidrolipoil-deshidrogenasa o la ferredoxina-NADP reductasa, exhiben potenciales redox medios próximos al de los piridín nucleótidos, en tanto que otras, tales como la succinato deshidrogenasa o las acil-CoA deshidrogenasas, presentan potenciales redox medios próximos al de la ubiquinona. Por último, la NADH deshidrogenasa -el complejo enzimático flavínico del sitio 1 de la cadena respiratoria- opera con una diferencia de potencial de hacia 0,3 V entre el NADH y la ubiquinona. En consecuencia, esta enzima es, a nuestro entender, un candidato excepcional para operar a dos potenciales redox medios y a dos  $pK_a$  alternantes y servir de transductor de la energía redox en energía ácido-base en el primer escalón de la cadena de transporte de electrones de la membrana citoplásmica de las bacterias o de la membrana interna de las mitocondrias (Losada, 1978, 1979b; Losada *et al.*, 1983), de acuerdo con los esquemas de las figuras 16 y 17 y de la siguiente secuencia de reacciones:



Debe subrayarse que la propia molécula flavínica acepta y cede, reversiblemente, un electrón y un protón no sólo a distintos potenciales y  $pK_a$  sino en diferentes sitios de la molécula, dando así, también,

cuenta de su carácter vectorial, que determina la translocación del protón durante el proceso de transducción de energía.

Respecto a los citocromos *b*-559 y *b*-564 transductores de cloroplastos y mitocondrias, respectivamente, los hechos resumidos más relevantes son, a nuestro entender, los siguientes (Losada, 1978, 1979a; Losada y Guerrero, 1979; De la Rosa *et al.*, 1981; Losada *et al.*, 1983; Hervás *et al.*, 1984, 1985): 1) Parecen estar situados en las cadenas fotosintética o respiratoria entre la plastoquinona o ubiquinona y el citocromo *f* o *c*, cubriendo un tramo de caída de potencial de hacia +0,3 V. 2) Ambos citocromos *b* exhiben un par estable de bajo potencial medio dependiente de pH, con una pendiente de -60 mV por unidad de pH, y un par inestable de alto potencial independiente de pH. 3) Este comportamiento corresponde a una forma reducida y protonada, común a ambos pares, y a dos formas oxidadas, a saber, una desenergetizada y no proto-

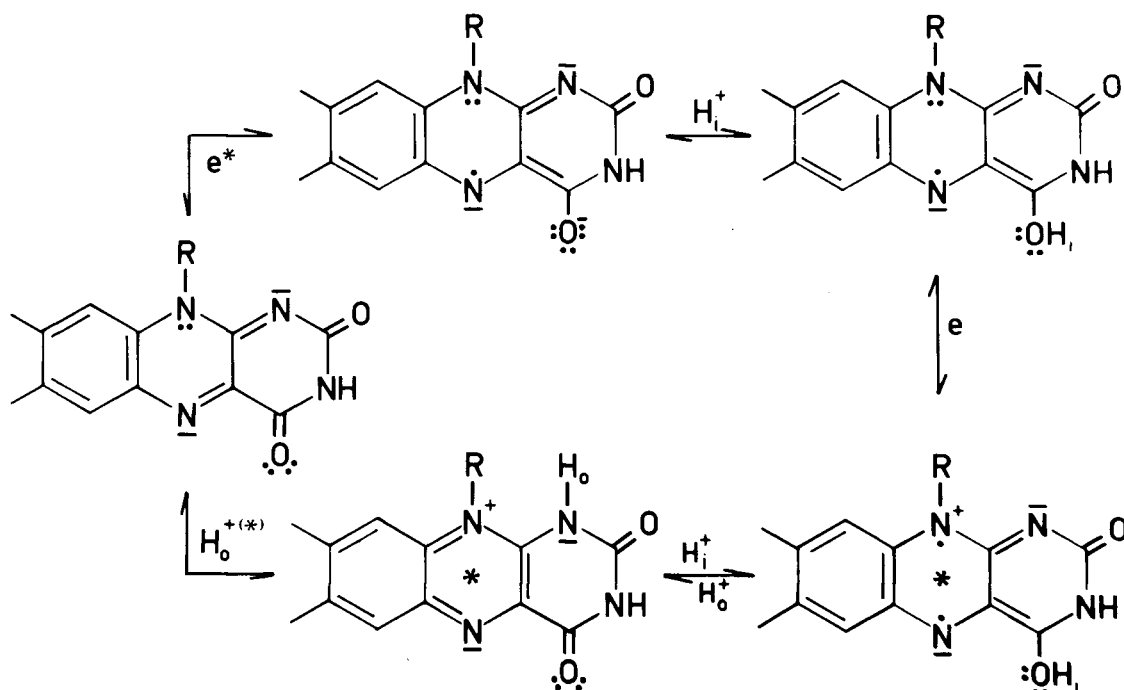


Fig. 16: Transducción reversible de energía redox en energía ácido-base por las flavinas. La forma oxidada acepta un electrón a bajo potencial ( $e^*$ ) y, subsiguientemente, se protona a alto pH ( $\text{H}_i^+$ ) en posición 4. La forma semiquinónica protonada cede un electrón a alto potencial ( $e$ ) y se energiza (\*), manteniendo el protón en posición 4. Esta forma oxidada y energizada -u otra similar, sin electrones desapareados y con la carga positiva en el nitrógeno opuesto- cambia su configuración electrónica y transloca el protón ( $\text{H}_i^+$ ) de la posición 4 a la posición 1 ( $\text{H}_0^+$ ). El ciclo se cierra cuando esta última forma oxidada y energizada (\*) libera, a bajo pH, su protón ( $\text{H}_0^{+*}$ ) en posición 1.

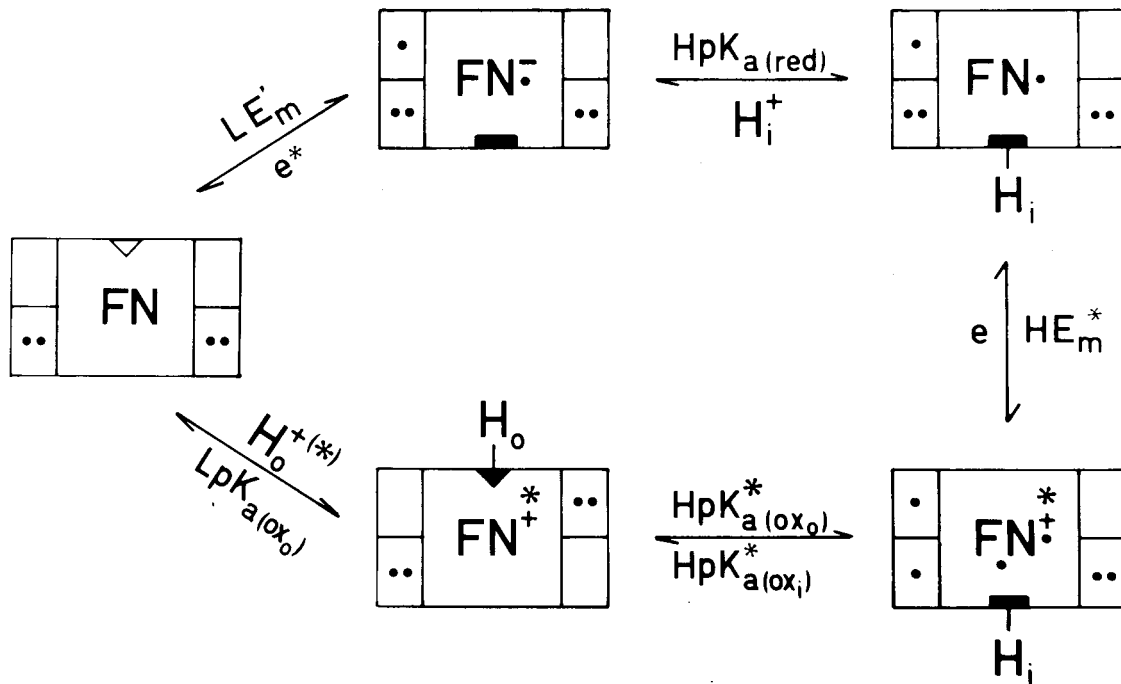


Fig. 17: Representación esquemática de la transducción reversible de energía redox en energía ácido-base por un sistema flavínico. En su estado basal oxidado (FN), la flavina acepta un electrón ( $e^*$ ) a bajo potencial ( $LE'_m$ ) de un donador adecuado y se convierte en la forma reducida semiquinónica  $FN^{\bullet-}$ , que exhibe, en su posición 4, un grupo de alto  $pK_a$  ( $HpK_a(\text{red})$ ), protonándose ( $H_i^+$ ) concomitantemente en dicha posición. La flavina reducida y protonada ( $H_iFN^{\bullet-}$ ) se energiza ( $*$ ) al oxidarse a alto potencial ( $HE'_m^*$ ) perdiendo un electrón ( $e$ ), pero mantiene en la posición 4 el protón previamente fijado ( $H_iFN^{\bullet+}$ ). A continuación, la flavina oxidada y energizada cambia su configuración electrónica y transloca su protón ( $H_i^+ \rightarrow H_o^+$ ) del grupo de alto  $pK_a$  en posición 4 ( $HpK_a^*(\text{ox}_i)$ ) al grupo, también de alto  $pK_a$ , en posición 1 ( $HpK_a^*(\text{ox}_o)$ ). Finalmente, esta nueva forma oxidada y energizada ( $*$ ) de la flavina ( $FNH_o^{\bullet+}$ ) disocia su protón ( $H_o^{\bullet+}$ ) en posición 1 a bajo  $pK_a$  ( $LpK_a(\text{ox}_o)$ ) desenergizándose a la forma oxidada inicial (FN). Para facilitar la comprensión de las reacciones redox y ácido-base implicadas en el proceso de transducción de energía se han representado esquemáticamente los pertinentes orbitales y grupos ácido-base de alto (símbolos llenos) y bajo (vacíos)  $pK_a$  de las formas reducidas y oxidadas, y protonadas y no-protonadas.

nada, y otra energizada y protonada. 4) En mitocondrias, la proporción entre ambos pares redox del citocromo *b*-564 depende reversiblemente del potencial de fosfato, aumentando hacia el de alto potencial con ATP y hacia el de bajo con ADP y  $P_i$ , o en presencia de desacoplantes. La acción energizante del ATP se ejerce a través de la ATP sintasa y se inhibe por la oligomicina. 6) Los agentes desnaturizantes, como el Triton, convierten el par de alto potencial en el de bajo, haciéndose éste entonces dependiente de pH; en cambio, el desacoplante carbonilciano-3-clorofenilhidrazona convierte el par de alto potencial en el de bajo, pero sin restaurarle su dependencia de pH. 7) La translocación vectorial de protones ligada a procesos redox parece ser, en principio, una propiedad intrínseca de los complejos cito-

crómicos transductores de cloroplastos y mitocondrias y, en el caso del citocromo *b*-559, se ha visto que se correlaciona estrechamente con la proporción de la forma oxidada del par de alto potencial.

De acuerdo con estos hechos, nuestra propuesta postula que los citocromos *b*-559 y *b*-564, así como el *b*-563 fotosintético, son sistemas transportadores de un electrón y un protón que funcionan alternativamente a dos potenciales redox medios y a dos  $pK_a$  alternantes, permitiendo la transducción de la energía redox en energía ácido-base, al mismo tiempo que la translocación de protones de un lado a otro de la membrana, según el esquema de la Figura 18, y de acuerdo con la siguiente secuencia de reacciones, referida a los citocromos fotosintéticos:



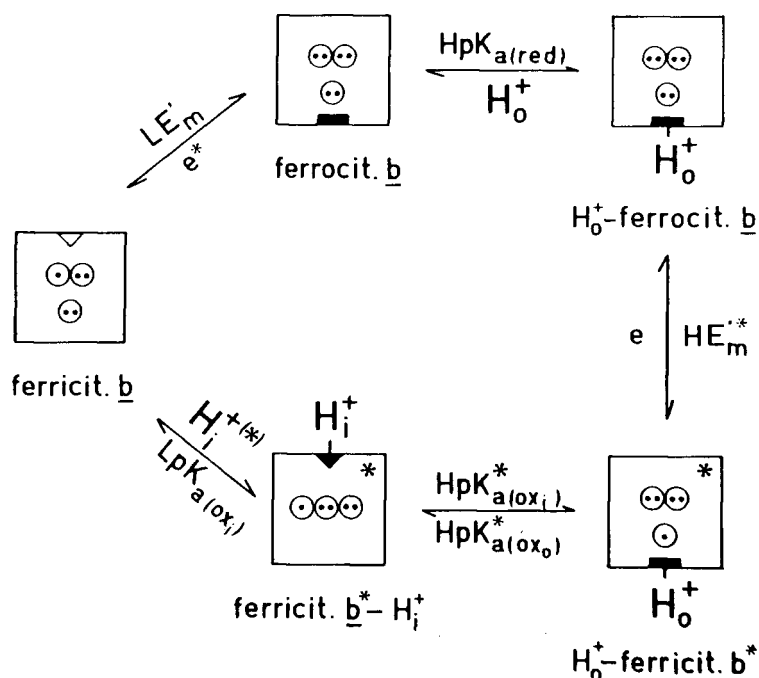
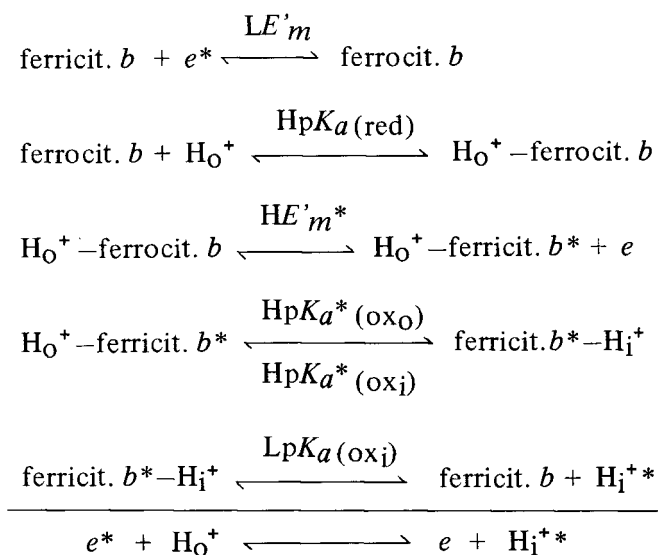


Fig. 18: Representación esquemática de la transducción reversible de energía redox en energía ácido-base por el citocromo *b*. La forma oxidada y desenergizada del citocromo (ferricit. *b*) acepta un electrón ( $e^*$ ) a bajo potencial ( $LE'_m$ ), lo que conlleva la aparición de un grupo de alto  $pK_a$  ( $HpK_a(\text{red})$ ) en la forma reducida (ferrocit. *b*), que, en consecuencia, se protona a alto pH ( $H_0^+$ ) en el lado del estroma. A continuación, la forma reducida y protonada ( $H_0^+$ -ferrocit. *b*) cede un electrón ( $e$ ) a alto potencial ( $HE'_m^*$ ) y se energiza ( $*$ ) manteniendo el protón en su misma posición ( $H_0^+$ -ferricit.  $b^*$ ). Esta forma oxidada y energizada del citocromo cambia su configuración electrónica, lo que conlleva la aparición de un nuevo grupo de alto  $pK_a$  ( $HpK_a^*(\text{ox}_i)$ ) y la desaparición del anterior ( $HpK_a^*(\text{ox}_o)$ ), con translocación del protón ( $H_0^+ \rightarrow H_i^+$ ). Finalmente, la última forma oxidada y energizada ( $*$ ) del ferricit.  $b^* - H_i^+$  disocia el protón a bajo pH ( $H_i^{+*}$ ) al espacio intratilacoidal desenergizándose a la forma oxidada de bajo  $pK_a$  ( $LpK_a(\text{ox}_i)$ ) y cerrando el ciclo. Los cinco y seis electrones de los iones férrico y ferroso, respectivamente, se han ubicado esquemática y provisionalmente en los tres orbitales *d* planares, en uno o dos niveles de energía. Asimismo, se han representado esquemáticamente los grupos ácido-base protonados o no protonados de las formas de alto (símbolos llenos) y bajo (vacíos)  $pK_a$  implicadas en el proceso de transducción de energía. El mecanismo de transducción podría, incluso, ser más simple, pero igualmente válido, participando sólo los dos orbitales *d* planares verticales y afectando también el cambio de configuración electrónica a la forma reducida.

La translocación de un protón en una molécula transdutora —tal como las flavinas o citocromos— puede ocurrir muy rápidamente, porque, de hecho (Fig. 19), no es el propio protón del grupo donador (AH) el que, como consecuencia del cambio de estado redox y de energización del sistema, emigra, él mismo, al grupo aceptor (B). En efecto, es bien sabido que la transferencia de protones en solución acuosa es más fácil y rápida que cualquier otro desplazamiento de átomos, ya que los protones pueden desplazarse en forma de cascada, como las fichas de un dominó, a lo largo de una cadena de moléculas de agua, unidas por fuentes de hidrógeno, de modo que cada protón avanza sólo el trecho entre dos átomos vecinos y que el protón que entra por un extremo e inicia la carrera empujando a su vecino es distinto del que la termina y sale por el otro. Siguiendo este símil, la Figura 19 representa esquemáticamente, con ciertas reservas obvias, el probable proceso de translocación de un protón por un sistema transdutor redox/ácido-base, con participación de los grupos aceptores y donadores de protones A y B, de afinidad alternante. Ante el desconocimiento de los grupos protonofóricos terminales y mediadores que —a través del propio grupo prostético y de las cadenas laterales de los aminoácidos de la proteína transdutora— puedan intervenir en la captación, translocación y liberación de los protones, se han simulado en el esquema —si bien sólo a título imaginario y explicativo— una serie de moléculas de agua dispuestas en cadena entre los grupos ácido-base terminales A y B.

En cuanto al citocromo  $a_3$  —el último eslabón de la cadena de transporte de electrones respiratoria— conviene resaltar que, en contraste con los citocromos  $b$ , parece pertenecer al tipo de sistemas transductores redox del tipo de forma reducida energizada (Losada, 1978, 1979a; Losada *et al.*, 1983) —ya que, según Wilson y Dutton (1970), su potencial redox estándar disminuye al energizarse la forma reducida del par por el ATP—, comportándose en este aspecto como la clorofila  $a$  de los centros de reacción de los fotosistemas, los prime-

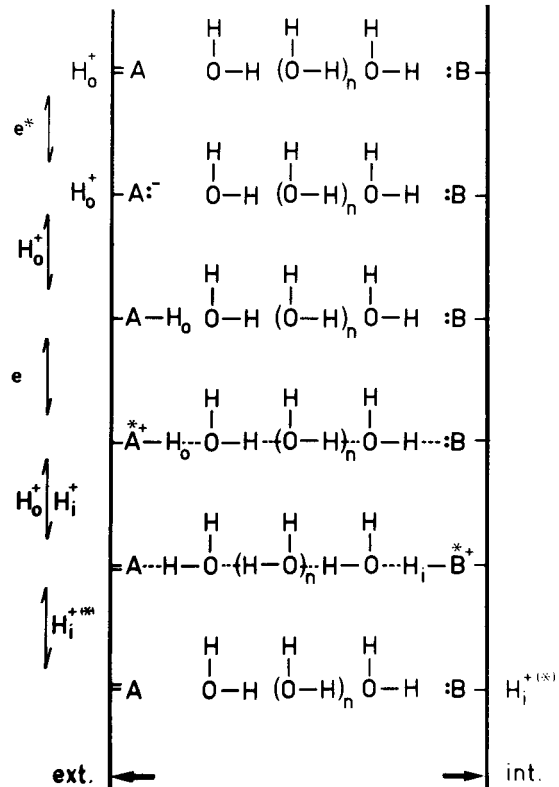


Fig. 19: Representación esquemática de la translocación reversible de protones por un sistema transdutor redox/ácido-base. La reducción a bajo potencial ( $e^*$ ) de la forma oxidada desenergizada conlleva la aparición en la molécula transdutora de un grupo de alto  $pK_a$  ( $A:^-$ ) que capta de afuera, por el lado considerado exterior (*ext.*), un protón pobre en energía ( $H_0^+$ ). La oxidación a bajo potencial ( $e$ ) de la forma reducida y protonada ( $A-H_0$ ) conlleva la energización de la molécula ( $*$ ) y mantiene el protón asociado al grupo A ( $A^+-H_0$ ). Esta molécula oxidada y energizada cambia su configuración electrónica, apareciendo en el lado considerado interior (*int.*) otro grupo de alto  $pK_a$  ( $:B^*$ ) que capta un protón pobre en energía ( $H_1^+$ ) al tiempo que el grupo A disocia el suyo ( $H_0^+$ ). Finalmente, la nueva forma oxidada y energizada ( $H_1-B^+$ ) disocia hacia dentro a bajo  $pK_a$  un protón rico en energía ( $H_1^{+*}$ ), cerrando el ciclo. Intencionadamente, y para simplificar, se ha usado como símil para el desplazamiento rápido del protón por "efecto túnel" una cadena hipotética de moléculas de agua entre los dos grupos ácido-base de afinidad alternante de la molécula transdutora.

ros agentes transductores de las cadenas fotosintéticas de transporte de electrones.

#### AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar sus agradecimientos a la Comisión Asesora de Investigación y Ciencia (España) por las ayudas recibidas, y a las Sras. A. Friend y M. J. Pérez de León por su valiosa colaboración en la elaboración del manuscrito.

## REFERENCIAS

- AMZEL, L.M.; PEDERSEN, P.L. (1983). Proton ATPases: Structure and mechanism. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 801-824.
- ARNON, D.I. (1977). Photosynthesis 1950-75: Changing concepts and perspectives. En *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series* (A. Trebst, M. Avron, eds.) Vol. 5, pp. 7-56. Springer Verlag, Berlin.
- ARNON, D.I.; ROSENBERG, L.L.; WHATLEY, F.R. (1954). A new glyceraldehyde phosphate dehydrogenase from photosynthetic tissues. *Nature* 173: 1132-1134.
- ATKINSON, D.E. (1981). TCA cycle confusion. *Trends Biochem. Sci.* 6: VI.
- BOTHE, H.; TREBST, A., eds. (1981). *Biology of inorganic nitrogen and sulfur*. Springer Verlag, Berlin.
- BOYER, P.D.; CHANCE, B.; ERNST, L.; MITCHELL, P.; RACKER, E.; SLATER, E.C. (1977). Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. *Ann. Rev. Biochem.* 46: 955-1026.
- CALVIN, M.; BASSHAM, J.A. (1962). *The photosynthesis of carbon compounds*. W. A. Benjamin, Nueva York.
- CANAU, P.; MANZANO, C.; GUERRERO, M.G.; LOSADA, M. (1980). Ferredoxin-dependent enzymatic reduction of nitrate with a deazaflavin photosystem. *Photobiochem. Photobiophys.* 1: 167-174.
- CARAFOLI, E.; SCARPA, A., eds. (1982). Transport ATPases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 402: 1-604.
- DE LA ROSA, F.F.; GALVAN, F.; LOSADA, M. (1981). Cytochrome *b*-559 as an energy-transducing redox system in non-cyclic photophosphorylation. En *Photosynthesis II. Electron transport and photophosphorylation* (G. Akoyunoglou, ed.) pp. 531-541. Balaban International Science Services, Philadelphia.
- DE LA ROSA, M.A.; NAVARRO, J.A.; DE LA ROSA, F.F.; LOSADA, M. (1983). Stabilization by high pH of hydrogen peroxide production with flavin photosystems. *Photobiochem. Photobiophys.* 5: 93-103.
- FISHER, R.R.; EARLE, S.R. (1982). Membrane-bound pyridine dinucleotide transhydrogenases. En *The pyridine nucleotide coenzymes* (J. Everse, B. Anderson, Kwan-Sa You, eds.) pp. 279-324. Academic Press, Nueva York.
- FUTAI, M.; KANAZAWA, H. (1983). Structure and function of proton-translocating adenosine-triphosphatase ( $F_0F_1$ ): Biochemical and molecular biological approaches. *Microbiol. Rev.* 47: 285-312.
- GOFFEAU, A.; SLAYMAN, C.W. (1981). The proton translocating ATPase of the fungi plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 639: 197-223.
- GOVINDJEE, ed. (1982). *Photosynthesis*. Academic Press, Nueva York.
- GUERRERO, M.G.; LOSADA, M. (1983). Conversión biológica de la energía solar. *Mundo científico* 3: 616-630.
- GUERRERO, M.G.; RAMOS, J.L.; LOSADA, M. (1982). Photosynthetic production of ammonia. En *New trends in research and utilization of solar energy through biological systems* (H. Mislin, R. Bachofen, eds.) pp. 59-64. Birkhäuser Verlag, Basilea.
- GUERRERO, M.G.; VEGA, J.M.; LOSADA, M. (1981). The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32: 169-204.
- HERREROS, B.; GARCIA SANCHO, J. (1981). TCA cycle confusion. *Trends Biochem. Sci.* 6: VI.
- HERVAS, M.; DE LA ROSA, F.F.; DE LA ROSA, M.A.; LOSADA, M. (1984). Coupling between redox and acid-base energy by cytochrome *b*-564 in baker's yeast mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 124: 807-814.
- HERVAS, M.; ORTEGA, J.M.; DE LA ROSA, M.A.; DE LA ROSA, F.F.; LOSADA, M. (1985). Location and function of cytochrome *b*-559 in the chloroplast non-cyclic electron transport chain. *Physiol. Vég.* 23: 593-604.
- HILL, R. (1965). The biochemists' green mansions: The photosynthetic electron-transport chain in plants. En *Essays in Biochemistry* (P.N. Campbell, G.D. Greville, eds.) Vol. 1, pp. 121-151. Academic Press, Nueva York.
- JACOB, J.L.; D'AUZAC, J. (1972). La glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase du latex d'*Hevea brasiliensis*. *Eur. J. Biochem.* 31: 255-265.
- KALCKAR, H. (1969). *Biological phosphorylations: Development of concepts*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J.
- KEILIN, D. (1966). *The history of cell respiration and cytochromes*. Cambridge University Press, Cambridge.
- KELLY, G.J.; GIBBS, M. (1973). A mechanism for the indirect transfer of photosynthetically reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate from chloroplasts to the cytoplasm. *Plant Physiol.* 52: 674-676.
- KREBS, H.A. (1981). *Otto Warburg, cell physiologist, biochemist and eccentric*. Clarendon Press, Oxford.
- KREBS, H.A.; KORNBERG, H.L. (1957). *Energy transformations in living matter*. Springer Verlag, Berlin.
- LEHNINGER, A.L. (1965). *The mitochondrion: molecular basis of structure and function*. W.A. Benjamin, Nueva York.
- LINDSKOG, S.; HENDERSON, L.E.; KANNAN, K.K.; LILJAS, A.; NYMAN, P.O.; STRANDBERG, B. (1971). Carbonic anhydrase. En *The enzymes* (P.D. Boyer, ed.) Vol. 5, pp. 587-665. Academic Press, Nueva York.
- LIPMANN, F. (1941). Metabolic generation and utilization of phosphate-bond energy. *Adv. Enzymol.* 1: 99-162.
- LOSADA, M. (1976). Reducing power and the regulation of photosynthesis. En *Reflections on biochemistry, in honour of Severo Ochoa* (A. Kornberg, B.L. Horecker, L. Cornudella, J. Oro, eds.) pp. 73-84. Pergamon Press, Oxford.
- LOSADA, M. (1978). Energy-transducing redox systems and the mechanism of oxidative phosphorylation. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 5: 296-310.
- LOSADA, M. (1979a). *Reflexiones en torno a la transducción biológica de la energía*. Real Academia de Medicina, Sevilla.
- LOSADA, M. (1979b). Photoproduction of ammonia and hydrogen peroxide. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 6: 205-225.
- LOSADA, M. (1985). Biological conversion of solar energy. En *Proceedings du XXIII congrés de coopération méditerranéenne pour l'énergie solaire* (V. Ruiz, M.G. Guerrero, eds.) pp. 9-22. ADESA, Sevilla.
- LOSADA, M.; GUERRERO, M.G. (1979). The photosynthetic reduction of nitrate and its regulation. En *Photosynthesis in relation to model systems* (J. Barber, ed.) pp. 365-408. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- LOSADA, M.; GUERRERO, M.G.; VEGA, J.M. (1981). The assimilatory reduction of nitrate. En *Biology of inorganic nitrogen and sulfur* (H. Bothe, A. Trebst, eds.) pp. 30-63. Springer Verlag, Berlin.
- LOSADA, M.; HERVAS, M.; DE LA ROSA, M.A.; DE LA ROSA, F.F. (1983). Energy transduction by bioelectrochemical systems. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 6: 205-225.
- LYNEN, F. (1976). My expedition into sulfur biochemistry. En *Reflections on biochemistry, in honour of Severo Ochoa* (A. Kornberg, B.L. Horecker, L. Cornudella, J. Oro, eds.) pp. 151-160. Pergamon Press, Oxford.

- METZNER, H. (1981). Energetik der Zelle. En *Die Zelle, Struktur und Funktion* (H. Metzner, ed.) pp. 313-355. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- MITCHELL, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* 191: 144-148.
- MITCHELL, P. (1979). Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* 206: 1148-1159.
- MOLLINEDO, F.; LOPEZ-MORATALLA, N.; PIVEL, J.P.; LARRAGA, V.; SANTIAGO, E.; MUÑOZ, E. (1981). Identification of bacterial energy-transducing ATPase as a metallo ( $Zn^{2+}$ ) protein. Effect of chelating agents and divalent metal ions on ATPase activity. *Eur. J. Biochem.* 119: 183-188.
- OCHOA, S. (1980). The pursuit of a hobby. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 1-30.
- POOLE, R.J. (1978). Energy coupling for membrane transport in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29: 437-460.
- PUPILLO, P.; FAGGIANI, R. (1979). Subunit structure of three glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases of some flowering plants. *Arch. Biochem. Biophys.* 194: 581-592.
- RACKER, E. (1976). *A new look at mechanisms in bioenergetics*. Academic Press, Nueva York.
- ROBERTSON, R.N. (1983). *The lively membranes*. Cambridge University Press, Cambridge.
- SCARBOROUGH, G.A. (1985). Binding energy, conformational change, and the mechanism of transmembrane solute movements. *Microbiol. Rev.* 49: 214-231.
- SENIOR, A.E.; WISE, J.G. (1983). The proton-ATPase of bacteria and mitochondria. *J. Memb. Biol.* 73: 105-124.
- SERRANO, R. (1984). Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump. *Curr. Top. Cell. Regul.* 23: 87-126.
- SINGER, T.P., ed. (1976). *Flavins and flavoproteins*. Elsevier, Amsterdam.
- SLATER, E.C.; BERDEN, J.A.; HERWEIJER, M.A. (1985). A hypothesis for the mechanism of respiratory-chain phosphorylation not involving the electrochemical gradient of protons as obligatory intermediate. *Biochim. Biophys. Acta* 811: 217-231.
- SOLIOZ, M. (1984). Dicyclohexylcarbodiimide as a probe for proton translocating enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 9: 309-312.
- SOLS, A.; GANCEDO, C.; DE LA FUENTE, G. (1971). Energy-yielding metabolism in yeasts. En *The yeasts* (A.H. Rose, J.S. Harrison, eds.) Vol. 2, pp. 271-307. Academic Press, Londres.
- STOECKENIUS, W.; BOGOMOLNI, R.A. (1982). Bacteriorhodopsin and related pigments of halobacteria. *Ann. Rev. Biochem.* 51: 587-616.
- SUN, I.L.; CRANE, F.L. (1975). Evidence for zinc function in the  $Mg^{++}/Ca^{++}$  stimulated ATPase of *Escherichia coli* membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65: 1334-1342.
- VAN NIEL, C.B. (1941). The bacterial photosyntheses and their importance for the general problem of photosynthesis. *Adv. Enzymol.* 1: 263-328.
- VILLALOBO, A.; BOUTRY, M.; GOFFEAU, A. (1981). Electrogenic proton translocation coupled to ATP hydrolysis by the plasma membrane  $Mg^{2+}$ -dependent ATPase of yeast in reconstituted proteoliposomes. *J. Biol. Chem.* 256: 12081-12087.
- WALD, G. (1966). On the nature of cellular respiration. En *Current aspects of biochemical energetics, Fritz Lipmann dedicatory volume* (N.O. Kaplan, E.P. Kennedy, eds.) pp. 27-32. Academic Press, Nueva York.
- WALKER, E.B.; LEE, T.Y.; SONG, P.S. (1979). Spectroscopic characterization of the Stentor photoreceptor. *Biochim. Biophys. Acta* 587: 129-144.
- WANG, J.H. (1983). Coupling of proton flux to the hydrolysis and synthesis of ATP. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 12: 21-34.
- WARBURG, O. (1964). Prefactory chapter. *Ann. Rev. Biochem.* 33: 1-14.
- WIESER, W. (1981). Involvement of water in TCA cycle. *Trends Biochem. Sci.* 6: XII.
- WILLIAMS, R.J.P. (1978). The multifarious couplings of energy transduction. *Biochim. Biophys. Acta* 505: 1-44.
- WILSON D.F.; DUTTON, P.L. (1970). The oxidation-reduction potentials of cytochromes *a* and *a<sub>3</sub>* in intact rat liver mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 136: 583-584.
- ZUMFT, W. (1981). The biochemistry of dinitrogen fixation. En *Biology of inorganic nitrogen and sulfur* (H. Bothe, A. Trebst, eds.) pp. 116-130. Springer Verlag, Berlin.