II. CADENA RESPIRATORIA

Dr. Héctor Alfredo Molina, Profesor Adjunto.

Cátedra de Química Biológica. Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina.

RESUMEN

En general, el grupo de enzimas y coenzimas encontradas en los procesos redox intracelulares, es conocido como "cadena de transporte electrónico", haciendo referencia al hecho que durante la misma se pierden o se ganan electrones, que determinan las oxidaciones y reducciones.

Se ha propuesto también, por razones más prácticas y experimentales, un término más neutral, que es el de "cadena respiratoria". Este nuevo nombre es también descriptivo y apropiado, quedando bien claro que las reacciones involucradas tienen por finalidad la captura del oxígeno o respiración.

SUMMARY

Collectively, the group of enzymes found in the intracellular redox assemblage is known by either of two names. The first term, "electron transport chain" refers to the fact that oxidation and reduction are defined as the loss or gain of electrons, so that any system designed to promote biologic oxidations must be so intimately related to electron flow, or transfer, that the name should properly represent that fact. Since the system involves a coupled sequence or "chain" of reactions, the name is highly descriptive and was long regarded as appropiate. More recently, the dogma that electron flow is the only possible driving force has been challenged. Therefore, it is not necessary to completely accept the older point of view. To avoid difficulty with the electromotive hypothesis, a more neutral term "respiratory chain" has been proposed. This newer name is also descriptive and appropiate, since it is clear that the reactions performed involve the uptake of oxygen, or respiration.

OXIDACIONES BIOLOGICAS

La cadena respiratoria se realiza en la membrana interna de la mitocondria y en sus salientes las crestas. La mayoría de los componentes de la cadena respiratoria existen como lipoproteínas en proporciones más o menos equimoleculares, lo que permite mantenerse bioquímicamente muy cerca entre sí dentro de las mitocondrias, organización que facilitaría su actividad. En una oxidación biológica los procesos redox se acoplan formando una cadena oxidativa. Los substratos que intervienen en el transporte de electrones e hidrógeno, se llaman cosubstratos, metabolitos de transporte o portadores, y durante la reacción pasan alternativamente de la forma oxidada a la forma reducida, y viceversa. En este sentido las mitocondrias funcionan como verdaderas baterías. La cadena respiratoria es como una cascada que va pasando de un nivel menor a otro nivel mayor y liberando por ese esfuerzo, en cada salto, cierta cantidad de energía que no se convierte en calor, sino en energía química (A.T.P.).

En la cadena respiratoria hay un equilibrio dinámico y en cada salto de cascada hay posibilidad de acoplarse a otras reacciones.

Recordemos que desde el punto de vista bioquímico el oxígeno posee el potencial redox (que se puede expresar en volts) máximo, por tener mayor afinidad por los electrones que todos los demás sistemas de las células vivas (+ 0,86 volts). Los valores más bajos los tienen los átomos de hidrógeno (− 0,43 volts) y tienen la menor atracción por los electrones. Las reacciones redox tienen como meta llevar los hidrógenos y electrones con potencial redox menor al nivel redox mayor (oxígeno) para formar agua, y a lo largo de este trayecto o cadena, se va movilizando energía, que para que sea compatible celularmente se "empaqueta" o fracciona adecuadamente. Las enzimas responsables de los procesos redox se llaman *deshidrogenasas*.

Se acepta universalmente que etapas redox mitocondriales en células aerobias están constituidas casi siempre por procesos bioquímicos que se pueden resumir de la siguiente manera:

a) catálisis piridín nucleotídica;

b) catálisis flavínica;

c) catálisis de ubiquinonas;

d) catálisis de citocromos.

Estas etapas concluyen con la formación de "Agua Redox" y las detallaremos a continuación.

CATALISIS DE LOS PIRIDIN NUCLEOTIDOS

Las deshidrogenasas nicotinamídicas son enzimas que catalizan la deshidrogenación de un substrato y requieren obligatoriamente la presencia de *N*icotina *A*mida *A*denina *D*inucleótido: *NAD* como coenzimas, fácilmente disociables del complejo enzima-coenzima.

Se trata de dinucleótidos constituidos por ácido adenílico o AMP y otro nucleótido cuya base nitrogenada es la vitamina PP (pelagropreventiva), que pertenece al grupo del complejo B, siendo la parte del NAD realmente activa, porque es la responsable del transporte transitorio de un hidrógeno y dos electrones. El hidrógeno se fija al anillo piridínico transferido con un par de electrones, es decir como "ion hidruro": (H:−). El

NAD fija reversiblemente el hidrógeno y el núcleo piridínico pasa de la forma aromática a la quinónica, lo que determina un cambio en el espectro de absorción luminosa, que nos permite determinar la velocidad de reacción enzimática (test óptico).

El NAD (ver fórmula al final) se encuentra en las mitocondrias y en el citoplasma. En la cadena respiratoria sólo se utiliza el NAD intramitocondrial.

Hay dos tipos de coenzimas:

CoI = DPN = NAD.

CoII = TPN = NADP (nicotina amida adenina dinucleótido fosfato). Los compuestos reducidos de NAD y NADP son depósitos de hidrógeno de la misma manera que el ATP es depósito de fósforo. El hidrógeno unido al NADP se usa más en la síntesis metabólica que en la cadena respiratoria. Trabajan con NADP enzimas como la málico-dehidrogenasa, isocítrico dehidrogenasa, etc.

Trabajan con NAD la alcohol-dehidrogenasa, la láctico-dehidrogenasa, etc. La única diferencia entre NAD y NADP es la presencia de un radical fosfato esterificado con la ribosa, carbono 2' del nucleótido de la adenina.

El espectro de absorción de los piridín nucleótidos es a los 260 nanómetros (nm). Su potencial redox es − 0,32 volts.

Los NAD han sido cristalizados, son solubles en agua y relativamente termoestables; se los encuentra en hígado, riñón, retina, cerebro y músculo.

La función del NAD en la cadena respiratoria es la de recibir los hidrógenos y los electrones de substratos reducidos (que poseen hidrógeno movilizable) y transportarlos a las flavinas oxidadas: Flavina Mono Nucleótido (FMN) y Flavina Adenina Dinucleótido (FAD).

El pasaje de NAD oxidado a NAD reducido, y viceversa, es inhibido selectivamente por arsenitos y ácido monoyodoacético en su paso de substrato reducido a NAD y desde éste a las flavinas la inhibición se puede realizar por barbitúricos (amytal). Ambos inhibidores se llaman de "origen" y de "transporte", respectivamente.

El NAD no es atacado por el oxígeno y funciona, como vemos, como un verdadero metabolito de transporte o cosubstrato. En su forma reducida se han encontrado 2 $NADH_2$, uno alfa y el otro beta, según la posición espacial del hidrógeno acoplado. Actualmente se utilizan símiles del NAD en donde se ha reemplazado el grupo —$CONH_2$ de la vitamina PP por —$COCH_3$ o por —$CSNH_2$ (tionicotinamida) con idéntica cinética enzimática.

Esquemáticamente su mecanismo de acción sería:

Substrato reducido: SH_2 + NAD (oxidado) ⇄ S + $NADH_2$ (reducido) (esta reacción debe ser catalizada por una enzima específica).

Luego $NADH_2$ + FN (oxidada) ⇄ NAD + FNH_2 (reducida) (acá también intervienen deshidrogenasas específicas).

CATALISIS DE LAS FLAVINAS

Para seguir el esquema anterior, la función de las flavinas sería FNH_2 (reducida) + Co Q (oxidada (*)) ⇄ FN (oxidada) + Co QH_2 (reducida).

Es decir que las flavinas captan hidrógenos y electrones de los piridín nucleótidos y se los ceden luego a la Co Q (ubiquinona).

Las flavín-enzimas son flavoproteínas cuyo núcleo prostético está constituido por isoaloxazina + ribitilo + fosfórico (FMN) y por isoaloxazina + ribitilo + fosfórico + AMP (FAD) (ver fórmulas al final). A ambas coenzimas se las llama FN (flavín-nucleótidos). Si están oxidadas están coloreadas, y si están reducidas, son leucobases o incoloras. La FMN también la llamaba "viejo fermento amarillo de Warburg", y la FAD es el "nuevo fermento naranja de Warburg", predominando estas últimas. En solución, estas coenzimas tienen fluorescencia amarilla verdosa debido a las bandas de isoaloxazina.

Su potencial redox es de − 0,20 volts, variando según la proteína y el pH tisular. Si se intenta extraer de la flavín-enzima el núcleo prostético, la enzima se desnaturaliza, por existir una unión muy fuerte entre enzima y coenzima.

A diferencia del NAD, reciben y transportan en su núcleo nitrogenado dos electrones y dos hidrógenos. Se acepta actualmente que al pasar las flavinas oxidadas a reducidas, y viceversa, necesariamente se forma una estructura semiquinoide en resonancia, denominada genéricamente "dímeros de semiquinona".

Buen número de las 65 flavín-enzimas que se conocen son metaloproteínas, con Fe, Mo, Zn, Mg, Mn, etc. Estos metales actuarían como: a) enlaces para conservar la energía; b) descomponer el hidrógeno en hidruros; c) estabilizar las formas semiquinónicas de las flavinas, etc. Ejemplos: xantinaoxidasa, succinodehidrogenasa, etc.

Muchas flavín-enzimas actúan directamente en la cadena respiratoria como verdaderas deshidrogenasas y en forma reversible. Otras actúan sobre diversos substratos reducidos, independientemente de la cadena respiratoria, y finalmente hay un tercer grupo de flavín-enzimas que aceptan y transfieren hidrógenos y electrones del oxígeno molecular, dando agua oxigenada, comportándose como verdaderas "oxidasas". Es decir pueden reaccionar con el oxígeno.

En las metalo flavín-enzimas se puede eliminar el metal tratándolas con 8-hidroxi-quinolina, que es un agente quelante, y que determina alteración de su actividad. Si se añade el metal correspondiente se recupera nuevamente la función enzimática.

Se sabe que la unión del núcleo prostético se hace a la porción proteica (apoenzima flavínica) participando esta última con dos grupos amínicos que se unen al ácido fosfórico y con un grupo fenólico que se une al N_3 de la isoaloxazina.

Es interesante recordar que al núcleo prostético de la FMN también se lo llama citoflavina o

(*) Co Q: coenzima; Q: ubiquinona.

fosforiboflavina, cuyo constituyente principal es la vitamina B_2.

CATALISIS DE LAS UBIQUINONAS

Las ubiquinonas se encuentran en todas las células aeróbicas de vegetales y animales. Son liposolubles y se las extrae con iso-octano de los tejidos. Este sistema se lo ha aislado de las mitocondrias a concentraciones relativamente altas. Se cree que las vitaminas K y E (quinona símiles) tienen semejantes funciones. Las "plastoquinonas" cumplen análogas funciones en el transporte de electrones en la fotosíntesis.

Las ubiquinonas actúan en la cadena respiratoria entre las flavinas y los citocromos. Su mecanismo es reversible.

El sistema redox se llama QUINONA $\rightleftarrows$ HIDROQUINONA y algunos autores lo llaman COENZIMA "Q" o Co Q, existiendo no un solo compuesto, sino una familia de ellos, cuya diferencia radica en el número de unidades isoprenoides. Así se tienen las coenzimas Q10, Q9, Q8, Q7, etcétera.

Su función es captar los hidrógenos y electrones de las flavinas reducidas y cederlos por doble mecanismo: los electrones son recibidos por los citocromos y el hidrógeno al medio ambiente, en espera que se complete la cadena respiratoria. Una de las enzimas que cataliza este proceso es la UBIQUINON-CITOCROMO-REDUCTASA.

La Co Q está vinculada directamente con el citocromo "b" y se encuentra formando parte de las lipoproteínas mitocondriales o asociadas a las mismas. El potencial redox de la Co Q es aproximadamente = 0 volts.

El transporte catalizado a nivel de la Co Q es inhibido selectivamente por la antimicina y la piericidina.

Sintéticamente su mecanismo de acción sería el siguiente:

a) $FNH_2 + Co\ Q \rightleftarrows FN + Co\ QH_2$

b) $Co\ QH_2$ + enzima específica $\rightleftarrows$ Co Q + 2 H + 2 e^-

c) 2 e^- + citocromo "b" oxidado $\rightleftarrows$ citocromo "b" reducido.

(Ver al final su estructura química derivada de la benzoquinona.)

CATALISIS DE LOS CITOCROMOS

Los *citocromos* constituyen un sistema redox por excelencia, ya que su hierro puede ceder o ganar un electrón: $Fe^{++} \underset{+e}{\overset{-e}{\rightleftarrows}} Fe^{+++}$. Simultáneamente su función es la de transportar los electrones cedidos por el sistema de las ubiquinonas, u otro sistema. Hay que mencionar que los citocromos *no transportan hidrógenos. Sólo electrones.*

Los citocromos fueron descubiertos por su propiedad de absorber la luz. Las bandas luminosas están entre 400 a 600 nm, existiendo una banda específica que es la de *Soret*. Los citocromos están fuertemente ligados a lipoproteínas mitocondriales, lo que hace difícil su extracción. Son los verdaderos catalizadores que hacen posible la respiración celular. Son proteínas conjugadas cuyo núcleo prostético es una ferroporfirina semejante al hemo de la hemoglobina. Las células anaeróbicas carecen de citocromos. Se conocen hasta el momento unos 25 citocromos, que actúan como catalizadores solos o con apoenzimas o proteínas específicas. Precisamente la magnitud del potencial redox depende en alto grado de la proporción y tipo de proteína a la que está unido.

Hay tres citocromos fundamentales: "a", "b" y "c", que a su vez se subdividen con distintos subíndices: c_1, c_2, c_3, c_4 y c_5; a_1, $a_{1,1}$, $a_{1,2}$; b_1, b_2, $b_{1,2}$, b_4, b_5 (que se encuentran en los microsomas). Se mencionan también los citocromos "f" y "h", pero que en realidad corresponden a variedades de citocromos "c" de vegetales y gastrópodos. Los subíndices también indican diferencias en las propiedades físico-químicas: punto isoeléctrico, electroforesis, potenciales redox, etc.

A diferencia de otras hemoproteínas (catalasas) que actúan con hierro férrico, los citocromos funcionan con hierro ferroso y férrico.

Su secuencia en la cadena respiratoria no es alfabética, sino así: citocromo "b", luego el "c" y finalmente el "a" que van pasando alternativamente de la forma oxidada a la reducida, y viceversa. Los citocromos "b" y "c" no reaccionan con el oxígeno y no son inhibidos por cianuros, ácido sulfhídrico, monóxido de carbono, etc., porque tienen su hierro profundamente incluido en la estructura proteica, cosa que no ocurre con el citocromo "a".

Los potenciales redox son los siguientes: citocromo "b": 0,15 volts; citocromo "c": 0,26 volts, y citocromo "a": 0,31 volts.

Si el hierro es Fe^{++} (ferroso) está reducido, si es Fe^{+++} (férrico), oxidado.

Sus pesos moleculares son muy variables; así el citocromo "c" tiene un P. M. de 12.500 y el citocromo "a" un P. M. de 530.000.

El citocromo "c" es el más estudiado, conociéndose su estructura primaria, secundaria y terciaria. Al citocromo "a" también se lo llama "fermento respiratorio de Warburg", citocromo-oxidasa, oxidasa final o indofenol-oxidasa. Es el único que reacciona con el oxígeno y es el último eslabón de la cadena respiratoria. Se identifican los citocromos "a_1" y "a_3" cuyas diferencias radican en el grado de unión o valencia y de muy difícil separación, lo que sugiere que la enzima sería la misma con distinto grado de disociación. Formarían polímeros.

Una vez que los citocromos "a" ($a_1 + a_{3}$) están cargados de electrones, se los transfieren al oxígeno, que ahora se carga de electrones, y el hierro de los citocromos cambia de valencia. Este oxígeno activado se combina con el hidrógeno separado por las ubiquinonas y forma "agua redox". Como cada molécula de citocromo es capaz de transportar un electrón y la cadena res-

piratoria se inicia con una pareja de electrones, se deduce, o bien, que la transferencia se hace en dos etapas sucesivas de un electrón o que dos moléculas de citocromo reaccionan a la vez, problema aún en discusión.

IMPORTANCIA DE LA CADENA RESPIRATORIA

Los siguientes hechos nos dan una idea de la importancia de la cadena respiratoria:

a) Se forma "agua redox", punto final de la cadena.

b) Se aclaran las funciones de algunas vitaminas, como coenzimas NAD y vitamina PP; FN y riboflavina; Co Q y vitamina K, etcétera.

c) Se produce la fosforilación oxidativa o biosíntesis de ATP, es decir que se contribuye esencialmente a la acumulación de energía.

d) Explica bioquímicamente la respiración celular.

e) La cadena respiratoria es el proceso más importante de regulación energética, movilizándose -57 kcal/mol, fraccionadas así: -13 kcal/mol entre NAD y FN; -16 kcal/mol entre FN y Co Q y -28 kcal/mol entre Co Q y oxígeno. El total de kcal/mol es semejante a la reacción directa pero explosiva, *in vitro*, de $H_2 + O \longrightarrow H_2O$.

La cadena respiratoria constituye un ejemplo de que en nuestro organismo no se forma ningún equilibrio químico verdadero. Es un equilibrio fluido, influido por el aporte de oxígeno, substratos, coenzimas, fósforo y potenciales redox.

Esquema tentativo de la cadena respiratoria en organismos aerobios

1. Alcohol + NAD + alcohol dehidrogenasa = aldehído + $NADH_2$
2. $NADH_2$ + FAD + deshidrogenasa = NAD + $FADH_2$
3. $FADH_2$ + Co Q + deshidrogenasa = FAD + Co QH_2
4. Co QH_2 = Co Q + 2 H^+ + 2 e^-
5. 2 e^- + 2 citocromo "b" oxidado = 2 citocromo "b" reducido
6. 2 citocromo "b" reducido + 2 citocromo "c" oxidado = 2 citocromo "b" oxidado + 2 citocromo "c" reducido
7. 2 citocromo "c" reducido + 2 citocromo "a_1" oxidado = 2 citocromo oxidado + 2 citocromo "a_1" reducido
8. 2 citocromo "a_1" reducido + 2 citocromo "a_3" oxidado = 2 citocromo "a_1" oxidado + 2 citocromo "a_3" reducido
9. 2 citocromo "a_3" reducido + oxígeno (O) = 2 citocromo "a_3" oxidado + $O^=$
10. 2 H^+ + $O^=$ = H_2O redox

Destaquemos que los 2H^+ PROVIENEN de la catálisis de la Co Q (paso 4) y que el oxígeno que reacciona finalmente con la citocromo-oxidasa (cit. a_1 + cit. a_3) proviene de la disociación a nivel celular que experimenta la oxihemoglobina:

$$HbO = Hb + O$$

Simultáneamente con la utilización del oxígeno se biosintetiza a partir de P + ADP = ATP. Esta biosíntesis tiene lugar en tres etapas de la cadena respiratoria:

1ª etapa: entre NAD y FAD

2ª etapa: entre citocromo "b" y citocromo "c"

3ª etapa: entre citocromo "a_1" y citocromo "a_3"

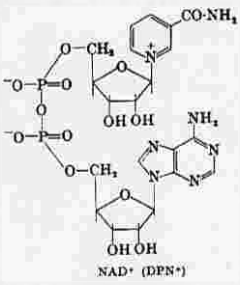
Por cada 3 ATP que se forman se consume un oxígeno, esto es:

3 ATP/1 O = 3 = cociente de fosforilación oxidativa o = cociente de oxidación fosforilante

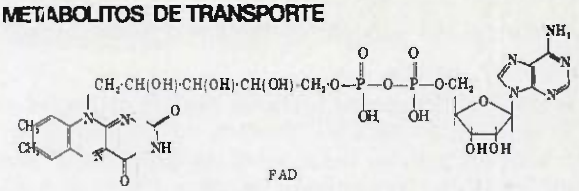
Como cada ATP acumula -7 kcal/mol y se producen 3 ATP en la cadena respiratoria, hacen un total de -21 kcal/mol, lo que representa un rendimiento práctico del 38,5 %, ya que lo que teóricamente se debería producir son -57 kcal/mol.

Para que el ADP + P nos dé el ATP se necesitan 0,15 volts de potencial redox.

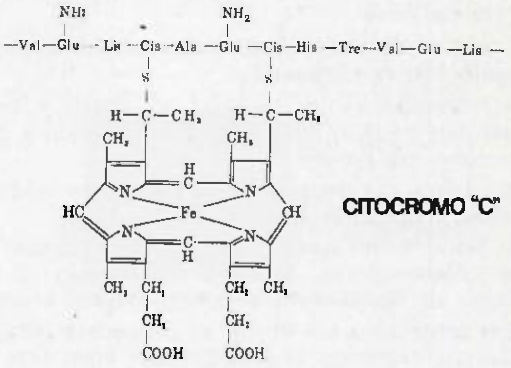
FORMULAS QUIMICAS DE LOS METABOLITOS DE TRANSPORTE



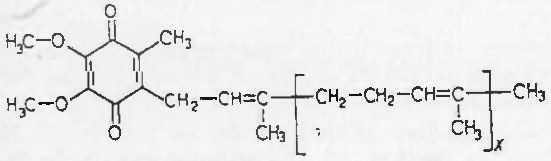
NAD+ (DPN+)



FAD



CITOCROMO "C"



COENZIMA "Q"

BIBLIOGRAFIA

1. Masters, C., Winzor, D.: "Evaluation of equilibrium constants for the interaction of L. D. H. with reduced NAD by affinity chromatography". Biochem. J., 151, 631-636, 1978.
2. Hashimoto, C.: "Purification of a substrate complex of cytochrome from liver microsomes of rabbits". Biochem. Biophys. Res. Commun., 68, 821-827, 1978.
3. Manssön, M.; Mattiason, B.: "Continuous regeneration of NADP+ by flavins covalently bound to Sepharose". Biotechnol. Bioeng., 18, 1145-1159, 1979.
4. Meyer, A.; Van Dan, K.: "Oxidation and energy conservation by mitochondria". Ann. Rev. Biochem., 40, 115-125, 1978.
5. "Bioenergetics". 2ª Ed. Benjamín, 1977.
6. Racker, E.: "The membrane of the Mitochondrion". Sci. Amer., 218, 32-45, 1979.