

## FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

### INTRODUCCIÓN

A través de las distintas rutas catabólicas analizadas hasta este punto, se ha ido produciendo una liberación de energía neta, en forma de ATP, y un segundo tipo de energía denominado poder reductor, en forma de coenzimas reducidos. Los principales coenzimas, que han participado en reacciones de óxido-reducción tanto en el citoplasma como en la mitocondria, son NADH y FADH<sub>2</sub>; los cuales iniciarán ahora, una ruta metabólica, la cadena de transporte electrónico o cadena respiratoria, que permitirá, por un lado, la recuperación de los coenzimas en su forma oxidada, y por otro, que los electrones sean conducidos a través de una serie de etapas sucesivas hasta el O<sub>2</sub>, para formar agua. En este proceso de transferencia electrónica es donde se producirá un fuerte desprendimiento energético aprovechado para la formación de enlaces de alta energía en forma de ATP.

La fosforilación oxidativa se define como la formación de ATP generada por la transferencia de electrones. Todas las rutas catabólicas, en los organismos aerobios, convergen para permitir el flujo de electrones hasta el oxígeno, produciendo energía para la generación de ATP constituyendo la etapa final del catabolismo de todas las biomoléculas.

### REACCIONES DE ÓXIDO-REDUCCIÓN

A la hora de analizar la cadena de transporte electrónico es importante realizar una breve consideración de las reacciones de óxido-reducción. Estas reacciones tienen lugar cuando hay una transferencia de electrones desde un dador, denominado reductor hasta un aceptor que se denomina oxidante.

Dador electrónico (reductor) ⇌ electrón + aceptor electrónico (oxidante).

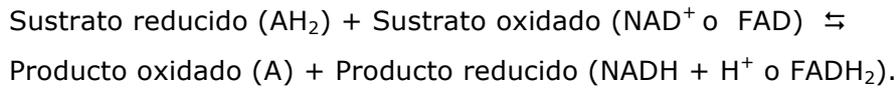
Los elementos que participan en estas reacciones pueden encontrarse en dos formas: oxidada y reducida formando un par redox conjugado.

Forma oxidada + electrón ⇌ Forma reducida.

Aunque la mayor parte del estudio de las reacciones de este tipo tienen como elementos participantes a iones metálicos, las moléculas orgánicas también pueden experimentar pérdida o ganancia de electrones, interviniendo como otro sustrato más en las reacciones de óxido-reducción. De las moléculas orgánicas más habituales se han citado ya los coenzimas NAD<sup>+</sup> y FAD. En la mayoría de las reacciones analizadas en las rutas metabólicas descritas, la transferencia es de electrones junto con hidrogeniones, o lo que es lo mismo átomos de hidrógeno, ya que:

$H \rightleftharpoons H^+ + e^-$

Desarrollándose de forma genérica la siguiente reacción:



Así una de las reacciones que transcurren en el ciclo del ácido cítrico:

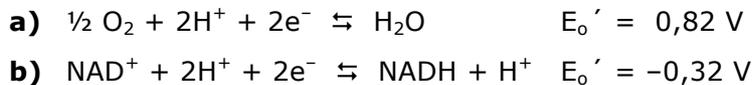


A las parejas Malato/Oxalacetato, y  $\text{NAD}^+/\text{NADH} + \text{H}^+$  se les denomina pares redox, y la capacidad que tiene cada uno de estos pares para captar o ceder electrones viene expresado por el potencial de óxido-reducción, o abreviadamente por potencial redox.

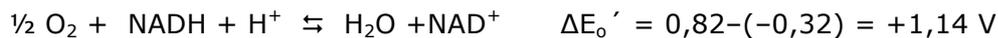
### CADENA DE TRANSPORTE ELECTRÓNICO

De forma sintética, en la cadena de transporte electrónico se produce la oxidación de los coenzimas reducidos, por el fuerte potencial redox del  $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ , y la reducción del oxígeno para formar agua.

Las reacciones parciales que ocurren son:



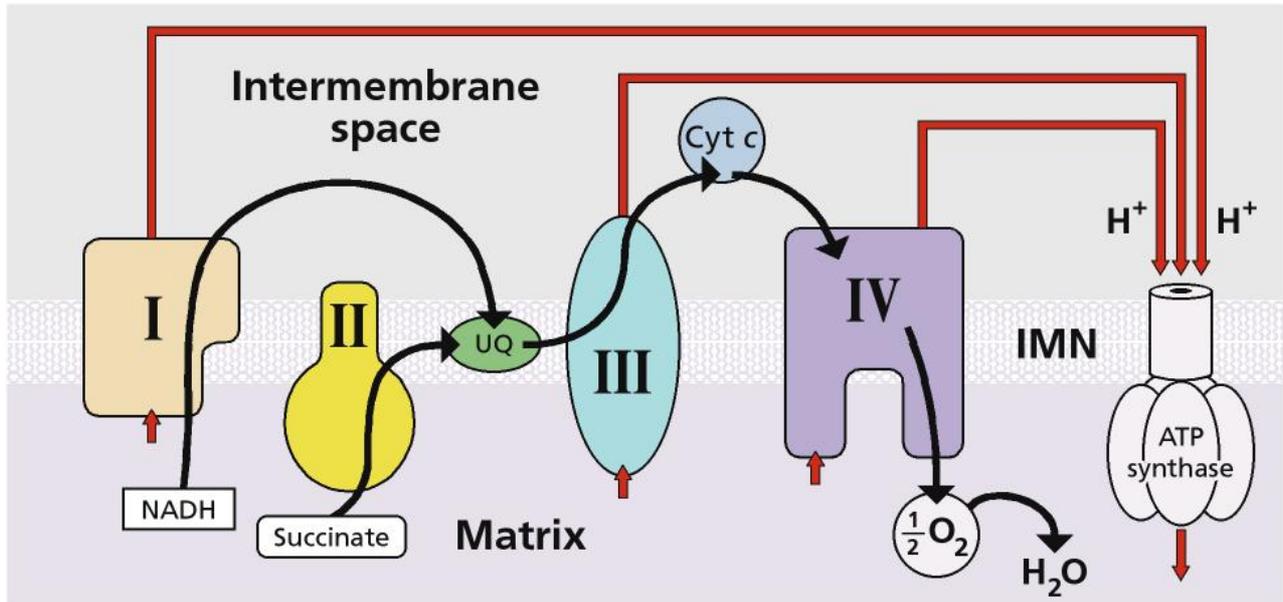
Y sustrayendo b de a, se obtiene la reacción global siguiente,



Al ser la diferencia de potencial entre estos pares tan grande, la variación de energía libre es también muy alta ( $\Delta G^{\circ'} = -52,6 \text{ Kcal/mol}$ ), lo que hace de esta reacción un proceso fuertemente exoergónico.

Esta diferencia de potencial constituye la fuerza directriz para el desarrollo de la cadena de transporte electrónica y de la fosforilación oxidativa. Para lograr el máximo aprovechamiento energético, el proceso de óxido-reducción no se desarrolla en una única reacción como la representada superiormente, sino que se desarrolla en una secuencia de varias reacciones. Este procedimiento permite distribuir el fuerte desprendimiento instantáneo de energía en cuantos menores, proporcionando una rentabilidad mucho mayor en forma de energía metabólica.

### Elementos de la cadena respiratoria

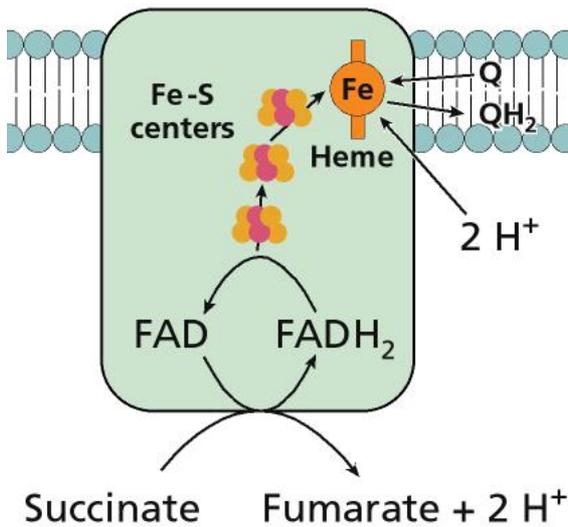
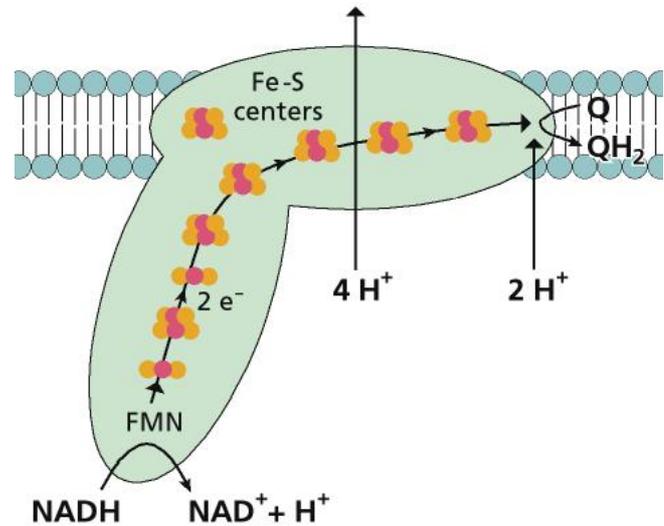


Esta ruta metabólica está formada por tres grandes complejos enzimáticos, denominados NADH-reductasa, citocromo reductasa y citocromo oxidasa, conectados entre sí por dos transportadores móviles de electrones que son la ubiquinona y el citocromo c. Los grupos transportadores de electrones en las proteínas enzimáticas son grupos prostéticos como las flavinas, complejos de hierro-azufre, grupos hemo e iones cobre.

La incorporación de los electrones procedentes de la coenzima  $FADH_2$  se lleva a cabo mediante un complejo distinto de los anteriores que es la succinato-reductasa. A diferencia de los tres complejos anteriores, que canalizan la energía desprendida en la reacción redox exoérgica en bombear protones de la matriz a la cara citoplasmática de la membrana, este último complejo no es capaz de realizarlo. Estos complejos están formados por pares redox con potenciales sucesivamente crecientes, que establecen un flujo direccional de electrones y un desprendimiento secuencial de energía.

### Reacciones del transporte electrónico

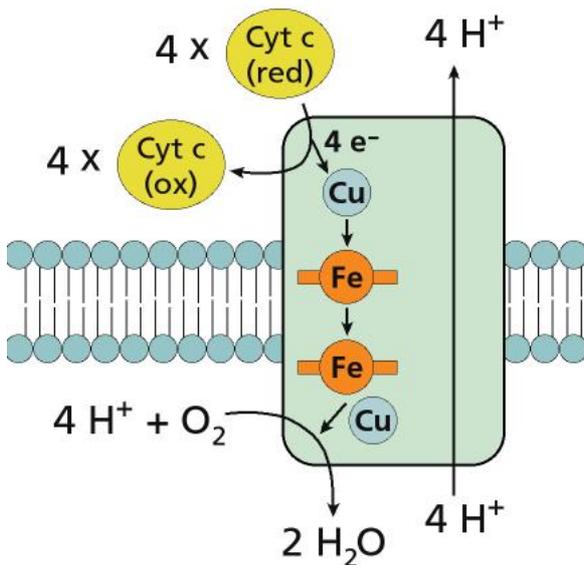
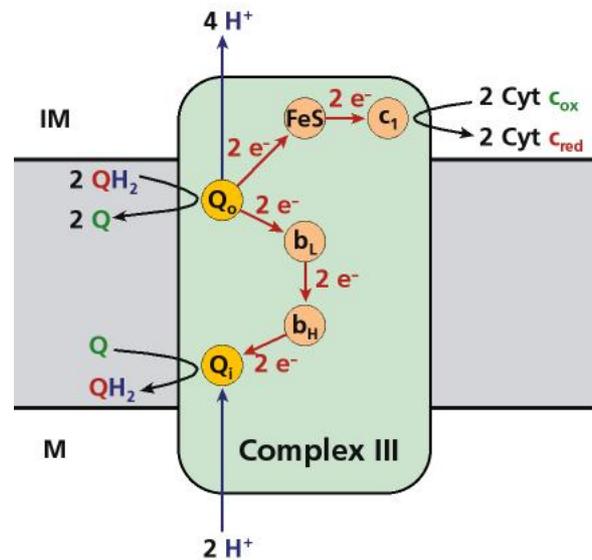
Las reacciones que tienen lugar a nivel de la NADH-reductasa o complejo I son una serie de reacciones redox, en las que intervienen un coenzima flavínico (FMN o flavina mononucleótido), y un centro ferrosulfurado en el que el átomo de hierro es el que realiza el intercambio electrónico para cederlos al coenzima Q. El flujo de dos electrones desde el NADH hasta el coenzima Q o ubiquinona, da lugar al bombeo de cuatro  $H^+$  a través de la membrana mitocondrial interna, desde la matriz hacia su cara citoplasmática.



El complejo II o succinato-reductasa se encuentra a nivel de la membrana, y uno de sus componentes es una enzima del ciclo del ácido cítrico, la succinato deshidrogenasa, que cataliza la reacción de succinato a fumarato. Uno de los productos de la reacción, el coenzima reducido FADH<sub>2</sub> no abandona el complejo, transfiriendo los electrones en el interior del mismo a un centro Fe-S, para posteriormente ser cedidos al coenzima Q. Esta es la única enzima del ciclo del ácido cítrico que no se encuentra libre en la solución de la matriz mitocondrial, sino que está fuertemente unida a la membrana mitocondrial interna. Por otro lado, algunas de las enzimas mitocondriales que utilizan FAD (acil-CoA deshidrogenasa, primer enzima de la  $\beta$ -oxidación), no introducen sus electrones a la cadena de transporte electrónico a través del complejo II, sino mediante una flavoproteína transportadora de electrones (ETFP- ubiquinona reductasa) que reduce directamente la ubiquinona o coenzima Q. El potencial de transferencia electrónica es menor en este complejo que en el anterior, y el desprendimiento energético no es suficiente para el bombeo de hidrogeniones, lo que se traducirá en un menor rendimiento de ATP, comparado con el obtenido cuando los electrones penetran en la cadena utilizando el complejo I.

condriales que utilizan FAD (acil-CoA deshidrogenasa, primer enzima de la  $\beta$ -oxidación), no introducen sus electrones a la cadena de transporte electrónico a través del complejo II, sino mediante una flavoproteína transportadora de electrones (ETFP- ubiquinona reductasa) que reduce directamente la ubiquinona o coenzima Q. El potencial de transferencia electrónica es menor en este complejo que en el anterior, y el desprendimiento energético no es suficiente para el bombeo de hidrogeniones, lo que se traducirá en un menor rendimiento de ATP, comparado con el obtenido cuando los electrones penetran en la cadena utilizando el complejo I.

La segunda bomba de hidrogeniones, se sitúa en el complejo III o citocromo-reductasa, que se caracteriza principalmente por disponer de grupos prostéticos hemo, similares a los de la hemoglobina, con un átomo de Fe que se alterna entre su estado reducido o ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y el estado oxidado o férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ). A través de la siguiente secuencia de reacciones los electrones son transferidos hasta el citocromo c, este flujo genera un potencial suficiente para bombear  $2 \text{ H}^+$  hacia el lado citoplasmático. La diferencia de potencial de transferencia es menor que en el complejo I y por lo tanto la capacidad de mover los hidrogeniones también es menor.



A través del último complejo, la citocromo-oxidasas acepta cuatro electrones del citocromo c, uno cada vez, a través de dos grupos hemo que utilizan átomos de cobre y los transfiere a una sola molécula de  $\text{O}_2$  formando dos moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$ . Se estima que el 90 % del consumo total de oxígeno de las células es realizado por la citocromo-oxidasas. El oxígeno molecular es un aceptor de electrones con un fuerte carácter oxidante, una alta tendencia a captar electrones, pero reacciona muy lentamente a menos que sea activado catalíticamente. Esta activación es realizada por este complejo, el cual también funciona como una bomba de protones, realizando un movimiento neto de  $4 \text{ H}^+$  hacia el espacio intermembrana.

## ACOPLAMIENTO FOSFORILACIÓN-OXIDACIÓN

Aunque han existido teorías múltiples que intentaban justificar la conexión entre estas dos funciones, ninguna se sostenía con los necesarios datos experimentales. El planteamiento de la hipótesis quimiosmótica o de Mitchell (Peter Mitchell, 1961) permitió la teorización y posterior corroboración del mecanismo de dicho acoplamiento. El transporte de electrones y la síntesis de ATP estaban acoplados a través de un gradiente de protones, o hidrogeniones, entre ambas caras de la membrana interna. El bombeo de protones, desarrollado por los diferentes complejos de la cadena de transporte electrónico, genera un aumento de concentración de  $H^+$  en la cara citoplasmática, y un gradiente eléctrico debido a la carga positiva movilizada por los protones hacia el exterior de la membrana.

Estos gradientes establecen una fuerza protomotriz (movera de protones) que empuja a los hidrogeniones hacia el interior, y utilizando esta fuerza, el complejo enzimático ATP-sintasa (también denominada ATPasa mitocondrial o  $H^+$ -ATPasa) formaría enlaces de alta energía en forma de moléculas de ATP.

### Síntesis de ATP

La ATP sintasa es un complejo enzimático de gran tamaño, observable a microscopía electrónica. Está formada por dos subunidades  $F_0$ , una porción hidrofóbica que atraviesa la integridad de la membrana mitocondrial interna, formada por cuatro cadenas polipeptídicas y que funcionalmente constituye el conducto de protones. La otra subunidad  $F_1$  protruye en el lado interno de la membrana, y está formada por cinco clases de cadenas polipeptídicas,  $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ . Su papel funcional es catalizar la formación de un enlace de alta energía, sintetizando ATP. El cuello intermedio que une ambas subunidades está formado a su vez por varias proteínas reguladoras.

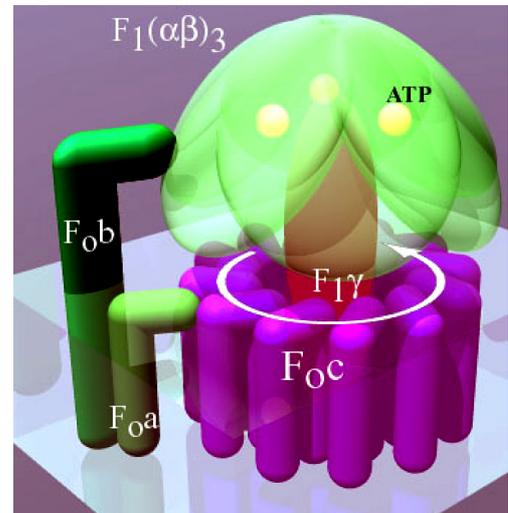


Imagen EN 3D DE las diferentes partes de la enzima (© Asw-hamburg).

El sistema mediante el cual funciona este complejo, ha permitido observar que el ATP se forma rápidamente, aún en ausencia de gradiente a través de la misma, pero la carencia de fuerza protomotriz no permite la separación del ATP formado, que permanece unido a la sintasa. Sólo el flujo de protones, la estimación es de forma aproximada de tres  $H^+$ , origina la liberación de un ATP. Cada par de electrones proveniente del NADH, genera un flujo neto de protones a través del complejo I, III y IV de 4, 2 y 4 protones respectivamente, lo que se traducirá en la síntesis de 3 ATPs, la entrada de electrones a través del  $FADH_2$  genera un flujo de protones a través del complejo III y IV de 2 y 4 respectivamente, que permitirá la formación de 2 ATPs.

## SISTEMAS DE TRANSPORTE MITOCONDRIALES

La membrana interna de la mitocondria se ha descrito ya como una membrana impermeable, lo cual obliga a que el intercambio entre el interior y el exterior de la mitocondria se realice mediante sistemas transportadores.

**a) Translocasas:** A nivel de la membrana interna existe una batería de proteínas destinadas a tareas de transporte, una de las más importantes es la ATP-ADP translocasa o translocasa de nucleótidos de adenina, a través de la cual estas moléculas, fuertemente cargadas (ATP y ADP), pueden ser movilizadas a través de la membrana interna.

Otros transportadores movilizan  $P_i$  con  $H^+$  (fosfato translocasa),  $H^+$  con piruvato (translocasa de monocarboxilatos), malato, succinato o fumarato (translocasa de dicarboxilatos), etc.

**b) Lanzaderas mitocondriales:** Uno de los sistemas que se utilizan para mover sustratos consiste en unirlos a moléculas que dispongan de un sistema de transporte. Otros tipos de lanzaderas son necesarios para poder trasladar los electrones, que en las reacciones de oxidación han quedado unidos a los coenzimas citoplasmáticos (fundamentalmente NADH) a la cadena de transporte electrónico. Al ser impermeable la membrana para el NADH, los equivalentes de reducción han de ser trasvasados de alguna forma, con el objeto de recuperar los coenzimas en su forma oxidada, y evitar que los procesos oxidativos citoplasmáticos se detengan.

La lanzadera del glicerol-fosfato es uno de los sistemas para llevar a cabo el tránsito de electrones, que funciona preferentemente en músculo esquelético y cerebro. Un metabolito de la glucólisis, la dihidroxiacetona-fosfato se reduce a glicerol-fosfato y por acción de una enzima de la membrana interna mitocondrial, glicerol-fosfato deshidrogenasa, se oxida de nuevo a dihidroxiacetona, liberándose al espacio intermembranoso. Los electrones se incorporan al coenzima FAD, que los introduce en la cadena de transporte electrónico, a nivel del coenzima Q. Así el NADH citoplasmático, al penetrar en la cadena en este punto, obtiene un rendimiento energético menor que el del NADH mitocondrial.

En las células hepáticas y fibras cardíacas, los electrones del NADH citoplasmático utilizan la lanzadera malato-aspartato, más compleja ya que se requiere la participación de dos transportadores de membrana y cuatro enzimas.

## **REGULACIÓN DE LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA**

La velocidad con que se desarrolla la fosforilación oxidativa está marcada por las necesidades energéticas de la célula. Para que el proceso se realice de forma correcta se requiere un aporte de sustratos como NADH (o FADH<sub>2</sub>), O<sub>2</sub>, ADP y P<sub>i</sub> siendo el más importante el ADP. La concentración intracelular de este metabolito es una medida de las necesidades de energía metabólica, y, por lo tanto, va a fijar la velocidad a la que ha de desarrollarse la fosforilación oxidativa. Esta regulación por ADP se denomina control respiratorio, ya que el consumo de O<sub>2</sub> por parte de la mitocondria, es dependiente de la cantidad de ADP presente.

Según la actividad celular desarrollada, se producirá un consumo mayor o menor de ATP, generándose cantidades variables de ADP. Una concentración elevada de ADP causará un incremento en la velocidad de la respiración celular o fosforilación oxidativa, intentando de manera continua reequilibrar la relación ATP/ADP, o expresado bajo otros términos, la síntesis de ATP se realiza según va siendo requerido por las necesidades celulares.

Todas las rutas catabólicas estudiadas tienen una regulación acoplada a la fosforilación oxidativa, que se realiza a través de la carga energética; de tal manera, que hay un engranaje correcto y equilibrado entre todos los procesos productores de energía con el consumo de la misma.