



Flores Herrera O, Riveros Rosas H, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E (eds). **Mensaje Bioquímico, Vol XXVIII**. Depto Bioquímica, Fac Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd Universitaria, México, DF, MÉXICO. (2004).

(<http://bq.unam.mx/mensajebioquimico>)

(ISSN-0188-137X)

LOS COMPUESTOS DE FOSFATO DE ALTA Y BAJA ENERGÍA.¹

Leopoldo de Meis and Gutemberg G. Alves
Depto Bioquímica Médica, Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade Federal do Rio de Janeiro
Rio de Janeiro, CEP 21.941-590 Brazil
demeis@bioqmed.ufrj.br

PHOSPHATE COMPOUNDS OF HIGH AND LOW ENERGY

Abstract.

Living organisms have evolved several ways to interconvert energy in its different forms, by using phosphate compounds such as adenosine triphosphate (ATP) as biological currency of energy exchange. ATPases are able to convert the energy derived from ATP hydrolysis into work. Also, a significant part of the total energy released may be dissipated in the surrounding environment as heat. In this work, we will review and discuss the processes of energy transduction, the notion of high and low energy phosphate compounds, and the evolution of two concepts: (i) that the energy derived from hydrolysis of phosphate compounds is only liberated before the hydrolysis of the phosphate bond and (ii) that the amount of energy released and the fraction of it that is converted into heat varies with the environment, e. g., if the compound is cleaved in solution or on the enzyme surface. We will also discuss some evidences indicating that ATPases can modulate the conversion of energy during the catalytic cycle determining the fraction of energy derived from the phosphate compound which will be converted into work and the fraction to be converted into heat. This concept is important for the understanding of thermogenesis and its role on cold resistance, control of body weight, and the mechanism several diseases like hyperthyroidism and adiposity, that are associated with misregulation of thermogenesis.

Keywords: adenosine triphosphate, ATP; phosphate bond; ATPases; energy transduction; solvation; phosphate hydrolysis; pyrophosphate; thermogenesis.

¹ Artículo traducido por: Edgar Vázquez Contreras.

Introducción

La energía es una cuestión central en la vida y para sobrevivir, los organismos vivos han encontrado varias maneras para interconvertir continuamente las diversas formas de energía disponibles en el ambiente. Los compuestos de fosfato son la materia biológica común de intercambio de energía y el trifosfato de adenosina (ATP) es el portador de energía más importante de la célula. Un grupo de enzimas conocidas como ATPasas pueden convertir la energía derivada de hidrólisis del ATP en el trabajo (contracción muscular), el transporte de iones (Ca^{2+} -ATPasa, $Na^{+}+K^{+}$ -ATPasa) o aún la producción de luz (luciferasa de las luciérnagas). No toda la energía derivada de hidrólisis de los compuestos de fosfato es convertida en trabajo por las enzimas; una parte significativa de la energía total se disipa en el ambiente circundante como calor.

Dos conceptos generales se encuentran comúnmente en la mayoría de los libros de texto de Bioquímica: primero, la energía derivada de hidrólisis de los compuestos de fosfato se libera en el momento exacto de hidrólisis del enlace de fosfato y segundo, la cantidad de energía liberada y la fracción de ella que se convierte en calor es siempre la misma sin importar si el compuesto se encuentra en solución o en la superficie de la enzima. Es decir las enzimas actuarían como catalizadores, no teniendo ningún efecto en la energía de hidrólisis del substrato ni controlando la fracción de la energía total liberada que se convierte en calor.

Estos dos conceptos ya no son válidos actualmente. Ahora sabemos que la energía de hidrólisis de los compuestos de fosfato varía considerablemente dependiendo de si se encuentra en solución o en la superficie de la enzima. Por otra parte, para las enzimas implicadas en la transducción de energía, la energía utilizada para realizar trabajo está disponible **antes** de la ruptura del compuesto de fosfato. La evidencia obtenida durante los últimos 5 años indica que las ATPasas pueden modular la conversión de la energía durante el ciclo catalítico, determinando la fracción de la energía derivada del compuesto de fosfato que será convertida en trabajo y la fracción que se convertirá en calor.

En este trabajo, discutiremos los procesos de transducción de energía, el concepto de compuestos de fosfato de alta y baja energía, así como el hecho de cómo algunas ATPasas pueden controlar y regular la cantidad de energía dirigida para generar trabajo o para producir calor. Este concepto es importante para la comprensión de la termogénesis y su papel en la resistencia al frío, así como el mecanismo de algunas enfermedades como el hipertiroidismo y la obesidad que se asocian con la pérdida de la regulación de la termogénesis.

Los compuestos de fosfato de alta y baja energía

El concepto inicial

La historia del ATP se remonta a los años 20's cuando Fiske y Subbarow [1] buscaban un método para la cuantificación de fosfato inorgánico (Pi) en los tejidos animales. Durante el curso de su experimento, purificaron al ATP y al fosfato de creatina de tejidos animales. En ese entonces no se conocía la importancia fisiológica de estos compuestos de fosfato. Tomó varios años para descubrir que estos compuestos eran portadores de energía y que su ruptura proporciona la energía necesaria para la contracción muscular. Fue hasta 1941 que los conceptos de compuestos de fosfato "ricos" y "pobres" en energía fue formalmente presentado por Lipmann [2] en una revisión en la cual analizaba sus datos y los obtenidos en otros laboratorios. En base al conocimiento disponible en aquella época, Lipmann propuso lo siguiente:

- (i) La energía que se deriva de hidrólisis de un compuesto de fosfato depende exclusivamente de la naturaleza química del enlace que liga el residuo de fosfato al resto de la molécula. El enlace de N-P del fosfato de creatina, el fosfato del enol del fosfoenolpiruvato, las uniones fosfoanhídrido del ATP y de PPI, y el enlace del acilfosfato del aspartil fosfato eran enlaces de fosfato ricos en energía típicos.
- (ii) Los enlaces de fosfato ricos en energía, son los que presentan una K_{eq} elevada para la hidrólisis en agua e inversamente, los enlaces de fosfato pobres en energía tendrían una constante de equilibrio baja para la hidrólisis. En este sentido, los fosfoésteres tales como la glucosa-6-fosfato y el glicerol fosfato son compuestos de fosfato típicos de baja energía.
- (iii) Se pensaba que la transferencia de un grupo fosfato desde una molécula hacia otra, dependía solamente de la energía de hidrólisis de los enlaces químicos. Así, el fosfato gama del ATP se puede transferir a una molécula de glucosa formando glucosa-6-fosfato, pero en condiciones fisiológicas, la reacción reversa no sería posible a menos que energía adicional fuera proporcionada al sistema. Entonces la única manera de regenerar cualquier molécula de ATP hidrolizado en la célula sería invertir compuestos de fosfato de energía igual mayor que el propio ATP, tal como por ejemplo la creatina.

Al inicio de los años 40's, poco se sabía sobre la estructura de las proteínas y del mecanismo catalítico de las enzimas. Por lo tanto, en la revisión de Lipman quedó implícito que la energía de hidrólisis de los compuestos de fosfato sería la misma sin importar si estuvieran unidos a la enzima o libres en solución.

En base a las formulaciones anteriormente descritas, se pensaba que la secuencia de eventos durante el proceso de la transducción de energía en enzimas, estaba compuesto por los siguientes pasos:

- (i) La enzima une al ATP;
- (ii) El ATP es hidrolizado y la energía se libera en el sitio catalítico en el momento exacto de la ruptura del enlace de fosfato.
- (iii) La energía es inmediatamente absorbida por la enzima y utilizada para realizar trabajo. Para la síntesis del ATP a partir de ADP y Pi, la secuencia de eventos sería igual, pero en orden inverso;
- (iv) La enzima ahora uniría al ADP y al Pi;
- (v) Una salida de energía en el sitio catalítico sería necesaria dirigir la síntesis del ATP;
- (vi) Una vez formada, la molécula del ATP será disociada de la enzima y difundirá en el citosol sin la necesidad de energía extra.

A partir de esta secuencia, se infirió que el trabajo sería realizado en la parte de la molécula de la enzima en donde se libera la energía *i.e.*, en la vecindad inmediata del sitio catalítico.

Estos conceptos permanecieron sin disputa desde la época de la revisión de Lipman en 1941 hasta 1970. Durante este período, la mayoría del trabajo se fue de naturaleza teórica y se pensaba que la naturaleza de "alta energía" del enlace de fosfato era dependiente de efectos

intramoleculares tales como resonancia de oposición, las repulsiones electrostáticas y la distribución del electrón a lo largo del esqueleto de la molécula [3-5].

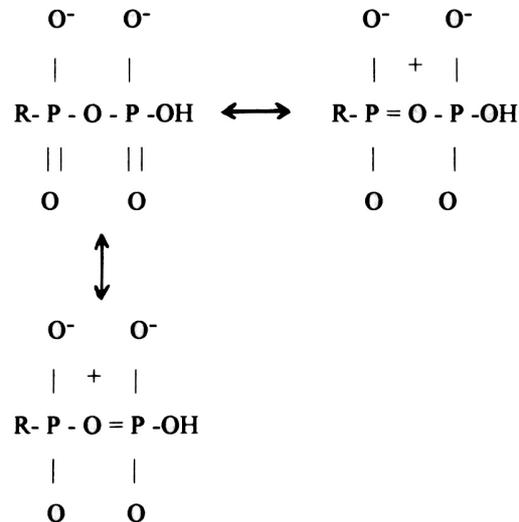


Figura 1. Las formas resonantes del pirofosfato.

Así se pensaba que la elevada constante de equilibrio (Keq) para la hidrólisis del PPI (PPI) y del ATP, estaba determinada por las cargas negativas y la resonancia de oposición del enlace P-O-P.

La carga negativa de cualquier lado del enlace se rechazaría, creando tensión dentro de la molécula y la resonancia de oposición generaría puntos de debilidad a lo largo del esqueleto. Consecuentemente, sería fácil romper la molécula y difícil mantener unidos a los productos de la reacción hidrolítica. La combinación de estos dos factores sería responsable de la elevada Keq para la hidrólisis de los enlaces del fosfoanhídrido del ATP o de PPI.

Nuevos conceptos- aproximación teórica

En 1970 y George colaboradores [6], concluyeron que en los sistemas biológicos los compuestos de fosfato están en solución y por tanto, interaccionan fuertemente con el agua (Tabla 1). Por lo tanto se esperaba que las moléculas de agua se organicen alrededor del compuesto de fosfato y que ambos protejan las cargas de la molécula, neutralizando así la repulsión electrostática, y además, formando puentes entre diversos átomos de la molécula, reforzando de esta forma los puntos débiles generados a lo largo de la esqueleto de la molécula por medio de resonancias opuestas.

George y colaboradores propusieron que la Keq para la hidrólisis de un compuesto de fosfato se debe determinar por las diferencias en energías de solvatación de los reactivos y productos y no por efectos intramoleculares como se había propuesto previamente [3,4]. La energía de solvatación es la cantidad de energía necesaria para remover a las moléculas de solvente que se organizan alrededor de una sustancia en solución. Mientras más solvatada sea la molécula es más estable o menos reactiva que aquella que está menos solvatada y la Keq

para la hidrólisis estaría determinada por la diferencia de energía de solvatación entre los reactivos y los productos. En este sentido, la K_{eq} de una reacción es alta cuando los productos están más solvatados que los reactivos.

Tabla 1. Energías de solvatación de diferentes formas de fosfato inorgánico y pirofosfato

Molécula	Energía de Solvatación Kcal/mol
$H_2PO_4^-$	76
HPO_4^{2-}	299
PO_4^{3-}	637
$H_3P_2O_7^-$	87
$H_2P_2O_7^{2-}$	134
$HP_2O_7^{3-}$	358
$P_2O_7^{4-}$	584

Valores reportados por George y colaboradores (1970). La energía de Solvatación se define como la energía necesaria para remover completamente al agua de solvatación de un compuesto.

Note en la Tabla 1 que las energías de solvatación del Pi varían de 76 a 637 kcal/mol y para el Ppi, varía entre 87 y 584 kcal/mol. La cuantificación de la energía libre de hidrólisis de Ppi en agua, varía entre -3 y -6 Kcal/mol (Tabla 2).

Tabla 2. Energía de hidrólisis de diferentes compuestos de fosfato en medios totalmente acuosos, en fase gaseosa y en mezclas de agua con solventes orgánicos.

Compuesto	ΔG^0 (Kcal/mol)		Mezclas de solvente orgánicos
	Agua	Fase gaseosa	
ATP	-7.0 a -9.0	---	+0.3
Ppi	-3.0 a -6.0	-0.4 a -0.9	-1.0 a + 2.0
Aspartil fosfato	-9.0 a -11.0	+5.0 a +32.0	+0.3 a +2.3
Creatina fosfato	-9.0 a -11.0	+9.0 a +212	---
Glucosa-6-fosfato	-1.5 a -3.0	-1.5 a -2.5	-1.5 a -2.5

Para detalles vea las referencias [13, 17]. La ecuación para la energía libre estándar de hidrólisis es $\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq}$, en donde R es la constantes general de los gases ($1.987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T es la temperatura absoluta y K_{eq} es la constante de equilibrio de la reacción. Un valor negativo de ΔG produce una K_{eq} elevada, lo que favorece la reacción.

Esto representa una fracción muy pequeña de la energía de solvatación total del Pi y Ppi (Tabla 1). De esta forma, un cambio pequeño en la organización del solvente alrededor de las moléculas de los reactivos y los productos sería suficiente para explicar la energía de hidrólisis del Ppi cuantificada. El trabajo de George y colaboradores seguía inadvertido por varios años. No fue hasta 1978 que la teoría de solvatación fue revisada y verificada por Hayes y colaboradores [7]. Estos autores calcularon la energía de hidrólisis de varios los compuestos de fosfato en fase de gaseosa, una situación en la cual los reactivos y los productos no están solvatados y compararon estos valores con los obtenidos en agua (Tabla 2). En solución acuosa, el acetilfosfato y los enlaces de N~P de la fosfocreatina y de la fosfoarginina son de alta energía.

Sin embargo, en la fase gaseosa, esto no es verdad. Por el contrario, la energía libre positiva de hidrólisis indica que cuando los reactivos y los productos no están solvatados, el acetilfosfato y la fosfocreatina son más estables que los productos de su hidrólisis, y según la definición de Lipmann, se comportan como compuestos de fosfato de baja energía. De manera interesante, el concepto de energía de solvatación parece ser válido solamente para los compuestos de fosfato de alta y no para los de baja energía porque los valores calculados para las energías de hidrólisis de la glucosa-6-fosfato y otros los fosfoésteres son iguales sin importar si las moléculas están en soluciones acuosas o en fase gaseosa [7].

Quantificaciones experimentales

En 1984 nos interesamos en la teoría de solvatación propuesta originalmente por P. George. La motivación fue el descubrimiento de que la misma especie química, un residuo acilfosfato, tendría diferentes energías de hidrólisis dependiendo, si está en solución (agua) o en la superficie de la enzima. Esto será discutido más adelante en una sección particular. Para probar experimentalmente la teoría de solvatación, medimos en nuestro laboratorio la energía de hidrólisis del PPi en medios con diversas actividades de agua. La estrategia adoptada fue medir la K_{eq} en medios acuosos que contenían diversas concentraciones de solventes orgánicos. De acuerdo con la propuesta de la teoría de solvatación, encontramos que un cambio discreto de la actividad de agua es suficiente para promover un cambio drástico en la energía de hidrólisis del PPi (Figura 2). En medios totalmente acuosos ($W_a = 1$), el ΔG° de hidrólisis de PPi fue -5 kcal/mol, pero se elevó a +1 kcal/mol cuando la actividad de agua del medio fue disminuida a 0.5 [8]. Entonces dependiendo de la actividad de agua del medio, el PPi podía cambiar de un compuesto de alta energía a uno de baja. Un año más tarde Wolfenden y Williams [9] encontraron que el ATP se podría sintetizar espontáneamente en cloroformo hidratado y recientemente Kirby et al. [10] observaron que el acetilfosfato se puede sintetizar espontáneamente en medios con actividad de agua disminuida. Contrastando con el PPi, el ATP y los residuos de acilfosfato, la actividad de agua no tiene prácticamente ningún efecto en la energía de hidrólisis de fosfoésteres tales como glucosa-6-fosfato. Así, en medio totalmente acuoso, el PPi se comporta como compuesto de alta energía cuando se compara con la glucosa-6-fosfato, pero en un ambiente hidrofóbico ($W_a = 0.5$) la glucosa-6-fosfato se convierte en un compuesto de fosfato con una energía de hidrólisis más alta que el PPi (Figura 2) [8,11,12]. Estos efectos de W_a en la energía libre de hidrólisis del PPi y de la glucosa-6-fosfato se pueden interpretar fácilmente según la teoría de la energía de solvatación [6,12,13], pero difícil de hacer coincidir con la propuesta de Lipmann (1941). Si la energía de la reacción estuviera determinada solamente por la naturaleza del enlace de fosfato roto, como se propuso en los años 40's, entonces la energía de hidrólisis de PPi no debería depender del W_a del medio y siempre ser más alta que la de glucosa-6-fosfato sin importar las condiciones.

Más que contribuir a la comprensión de la naturaleza química de los compuestos de fosfato de alta y baja energía, estos resultados tienen implicaciones fisiológicas importantes en procesos biológicos de la transducción de energía. Un ejemplo es la síntesis fotosintética del PPi que se discute a continuación.

PPi de alta y baja energía

Los cromatóforos de las bacterias fotosintéticas *R. rubrum* contienen una enzima pirofosfatasa inorgánica membranal, que sintetiza PPi cuando un gradiente electroquímico de protones se forma a través de la membrana de los cromatóforos iluminados. Cuando la luz se apaga (en oscuridad), el PPi sintetizado previamente es metabolizado por la enzima antes mencionada (Figura 3).

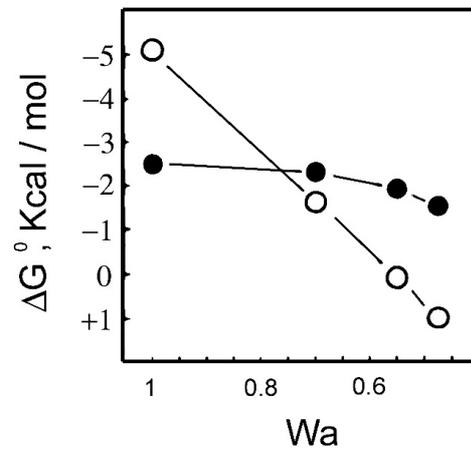


Figura 2. Efecto de la actividad de agua en las energías de hidrólisis del PPI y la glucosa-6-fosfato. Los círculos vacíos representan al PPI, los círculos llenos representan a la glucosa-6-fosfato. Para detalles experimentales vea [13].

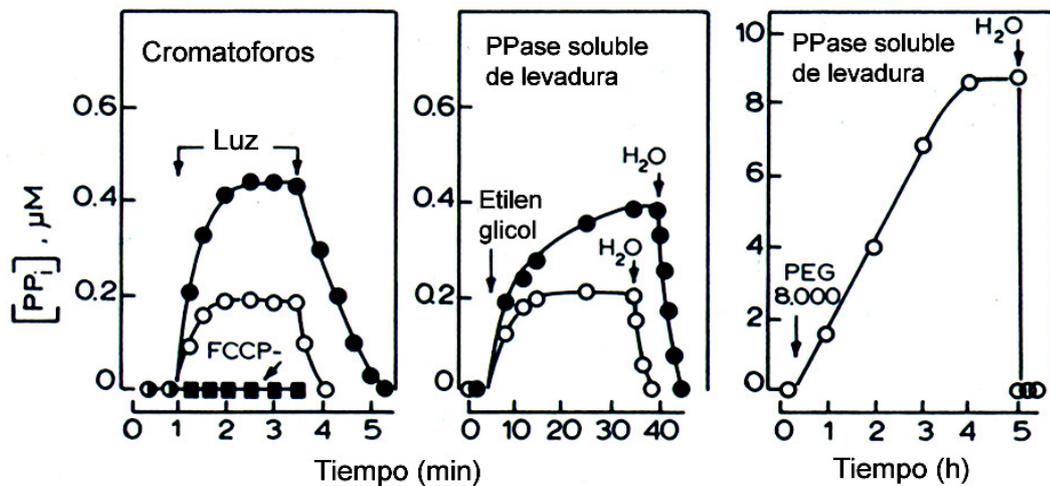


Figura 3. Síntesis de PPI por los cromatóforos de *R. rubrum* y por la pirofosfatasa inorgánica soluble de levadura (PPase). Los círculos llenos indican la presencia de 1 mM de Pi y los vacíos de 2 mM. Los cuadros representan la presencia de un ionóforo de H^+ (FCCP). En el panel central el solvente utilizado fue etilenglicol, en el de la derecha fue poli(etilenglicol) 8000. Para más detalle refiérase a [15].

El ciclo de transducción de energía medido con los cromatóforos se puede reproducir por un pirofosfatasa soluble, sin la necesidad de la membrana, de la clorofila o de la luz [14,15]. La enzima soluble puede sintetizar PPI en la oscuridad cuando la actividad de agua del medio es reducida por la adición de solventes orgánicos. En esta condición, el ΔG° de hidrólisis de PPI tiene un valor positivo, es decir, el PPI no es un compuesto de alta energía y se sintetiza

espontáneamente (Figura 3). Si entonces diluimos el medio con agua, para disminuir la concentración del solvente orgánico y aumentar la actividad de W_a del medio, el PPI sintetizado previamente es metabolizado por la enzima porque ahora el PPI se ha convertido en un compuesto de alta energía con una Keq alta para la hidrólisis. Estos experimentos indican que:

- una disminución de W_a puede desempeñar un papel en el mecanismo por el cual la energía derivada del gradiente electroquímico generado por la luz es utilizado para la síntesis de PPI en los cromatóforos de *R. rubrum*.
- para la síntesis del PPI, la energía no es necesaria para la formación del enlace covalente del PPI como se pensaba en los años 40's, sino al contrario para modificar el ambiente de un punto bajo de actividad de agua a uno elevado. En el primer ambiente el PPI es un compuesto de fosfato de baja energía y se forma espontáneamente mientras que en el segundo ambiente se convierte en un compuesto de fosfato de alta energía.

Conversión de enlaces fosfato de alta energía en baja energía en el sitio catalítico de las enzimas

Durante las últimas cuatro décadas se ha aclarado el ciclo catalítico de varias enzimas implicadas en procesos de transducción de energía [16-22]. Estos estudios revelaron que la energía de hidrólisis de diversos compuestos de fosfato varía considerablemente dependiendo de si están en solución o unidos a la enzima (Tabla 3). Las reacciones que se pensaban prácticamente irreversibles en solución acuosa, ocurren espontáneamente cuando los reactivos están unidos a la enzima. Según estos resultados, la energía para realizar trabajo no está disponible para la enzima en el momento de la ruptura del compuesto de fosfato.

Tabla 3. Variación de la energía de hidrólisis de compuestos de fosfato durante el ciclo catalítico de enzimas transductoras de energía.

Enzima	Reacción	Solución (antes del trabajo)		Unido a la enzima (después del trabajo)	
		Keq (M)	ΔG^0 (Kcal/mol)	Keq (M)	ΔG^0 (Kcal/mol)
Ca^{2+} -ATPasa	Aspartil fosfato (hidrólisis)	10^6	-8,4	1,0	0
$(Na^+ + K^+)$ ATPasa	ATP (hidrólisis)	10^6	-8,4	1,0	0
F1-ATPasa, Miosina	PPI (hidrólisis)	10^4	-5,6	0,5	-0,9
Pirofosfatasa Inorgánica					
Hexoquinasa	$ATP + \text{glucosa} \rightarrow \text{Glc-P} + ADP$	2×10^3	-4,6	1,0	0

Para detalles vea las referencias [13, 17]. La ecuación para la energía libre estándar de hidrólisis es $\Delta G^{0'} = -RT \ln (Keq)$, en donde R es la constante general de los gases ($1.987 \text{ cal K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), T es la temperatura absoluta y Keq es la constante de equilibrio de la reacción. Un valor negativo de ΔG produce una Keq elevada, lo que favorece la reacción.

Para las ATPasas del transporte iónico, la energía necesaria para desplazar los iones a través de la membrana está disponible antes de la ruptura del compuesto de fosfato [17]. Durante el ciclo catalítico hay una disminución considerable de la Keq para la hidrólisis del compuesto de fosfato unido a la enzima (residuo de acilfosfato) y el transporte a través de la

membrana se acopla con esta transición de la K_{eq} y no con la ruptura del compuesto de fosfato. La hidrólisis parece ser necesaria para permitir solamente la disociación de los productos de hidrólisis de la enzima y no para proporcionar energía al sistema.

Para la ATPasa de la actomiosina, la energía está disponible cuando el ADP y (o) el Pi se disocian de la enzima y no cuando se hidroliza el ATP [23-25]. La K_{eq} para la hidrólisis del ATP en el sitio catalítico de la actomiosina es cerca de 1, es decir, la hidrólisis del ATP no implica un cambio significativo de la energía libre.

Según estos nuevos resultados, la secuencia de eventos para la transducción de energía en ATPasas de transporte o actomiosina son como sigue:

- (a) La enzima une al ATP u otros compuestos de fosfato;
- (b) La enzima realiza trabajo sin que el compuesto de fosfato sea hidrolizado. Esto es acompañado por una disminución del nivel de energía del compuesto de fosfato;
- (c) El compuesto de fosfato se rompe y los productos de hidrólisis se disocian de la enzima en un proceso que implica un cambio de energía relativamente pequeño.

En el proceso inverso, los compuestos de fosfato tales como ATP, PPI y el residuo de acilfosfato se sintetizan en el ambiente hidrofóbico del sitio catalítico de la enzima sin necesidad de energía, es decir, la energía se necesita entonces para la conversión del compuesto de fosfato de "baja energía" en un compuesto de "alta energía". Esta conversión estaría acompañada por una transición hidrofóbica (W_a bajo) - hidrofílica (W_a alto) en el sitio catalítico de la enzima. La síntesis de ATP y de PPI por la ATP sintasa mitocondrial, involucra un cambio conformacional de la proteína que permite la disociación del ATP y de PPI en el medio hidrofílico del ensayo. Para las ATPasas de transporte tales como la Ca^{2+} -ATPasa, la transición hidrofóbica-hidrofílica ocurre en el sitio catalítico. La información disponible actualmente sobre la estructura de las ATPasas de transporte indica que el trabajo se realiza en una región de la estructura terciaria de la proteína distante a aquella donde se localiza el sitio catalítico y que los cambios conformacionales de la proteína sincronizan la secuencia de evento que ocurren en estas dos regiones [21-22].

La propuesta de que la conversión del compuesto de fosfato de alta energía en el de baja, es promovida por un cambio del W_a en el sitio catalítico de las enzimas se ha verificado por medio de cuantificaciones de la actividad enzimática en medios con diversos W_a . Se ha demostrado que las enzimas que utilizan la energía de un gradiente químico para sintetizar el ATP a partir del ADP y del Pi pueden promover esta síntesis incluso en ausencia del gradiente, simplemente por el cambio en la actividad de agua del medio. Esto fue demostrado por primera vez con la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico [17,26], la $(Na^+ + K^+)$ -ATPasa [27] y la porción F1 soluble de la ATPasa mitocondrial [28-32]. En este último caso, la adición de un solvente orgánico promueve una disminución dramática de la K_m aparente de la enzima por el Pi y un aumento considerable en la cantidad ATP unido fuertemente en el sitio catalítico de la F1-ATPasa.

Transducción energética y producción de calor en las ATPasas de transporte

En las reacciones que implican la transducción de energía, solamente una parte de la energía química liberada durante la hidrólisis del ATP se convierte en trabajo u otras formas de energía tales como energía osmótica. La otra parte se convierte en calor, y en animales endotérmicos, el calor liberado se utiliza para mantener la temperatura del cuerpo constante y alta.

El interés en la producción del calor y la termogénesis ha aumentado durante la última década debido a sus implicaciones para la salud y enfermedad. Las alteraciones de la termogénesis se observan en varios desórdenes, tales como el control del peso corporal y la disfunción endocrina [33], en el hipertiroidismo hay una disminución del peso corporal, y un aumento del metabolismo basal y de la tasa de producción de calor, al hormona tiroidea T3 (3,5,3'-tri-iodo-L-tironina) está implicada en la regulación térmica de vertebrados [34].

Hasta hace algunos años, se asumía que la cantidad de calor producida durante la hidrólisis de una molécula del ATP era siempre igual y que no se podría modular por las enzimas, como si la energía liberada durante la hidrólisis del ATP fuera dividida en dos porciones no intercambiables: una sería convertida en calor, la otra utilizada para el trabajo. Contrastando con esta posición, se encontró recientemente que algunas enzimas pueden manejar la energía derivada de hidrólisis del ATP de tal manera que determinan cuánta energía se utiliza para el trabajo y cuánta se disipa como calor [35-46]. En este sentido, la cantidad total de energía liberada durante la hidrólisis del ATP es siempre igual, pero la fracción de la energía total que se convierte en trabajo o calor se modula por la enzima. Esto fue demostrado originalmente para la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico y más adelante para la hexoquinasa [47] y pirofosfatasa de plantas [48].

Para la Ca^{2+} -ATPasa se encontró que la cantidad de calor liberada durante la hidrólisis del ATP varía dependiendo de si el residuo de acilfosfato formado a partir del ATP es hidrolizado antes o después de su transformación de "alto" a "bajo" contenido de energía [40-42,46]. El transporte de Ca^{2+} a través de la membrana ocurre durante esta conversión. Si la ruptura sucede cuando el acilfosfato tiene una alta energía de hidrólisis (ambiente hidrofílico en el sitio catalítico) entonces toda la energía derivada de la ruptura se convierte en calor y no se utiliza nada para el transporte de Ca^{2+} . Inversamente, cuando el acilfosfato bajo en energía se rompe (ambiente hidrofóbico en el sitio catalítico) una buena parte de la energía se utiliza para el transporte de Ca^{2+} y poca energía queda disponible para ser convertida en calor. La regulación de la producción del calor depende por lo tanto del cociente entre los residuos del acilfosfato de alta y baja energía rotos durante catálisis. Existen varias isoformas de Ca^{2+} -ATPasas sarco / endoplásmicas (SERCA) y la cantidad de calor producida durante la hidrólisis del ATP y el transporte de Ca^{2+} varía dependiendo de la isoforma utilizada. Esta variabilidad depende de la frecuencia de la ruptura del residuo de acilfosfato de alta energía [44]. La hormona tiroidea T3 regula la expresión de varias isoformas de SERCA. En el hipertiroidismo, una condición donde el índice de la producción de calor aumenta, las isoformas de SERCA que producen más calor (SERCA 1) están expresadas. Recientemente, fue demostrado que la administración a conejos de T4 (un precursor de T3) promueve un aumento en los índices de la actividad desacoplada de la ATPasa y de la producción del calor en vesículas del retículo sarcoplásmico, con un comportamiento que depende del tipo del músculo utilizado [49]. Esto sugiere que la actividad desacoplada Ca^{2+} -ATPasa puede ser una de las fuentes de calor que contribuyen a la termogénesis en el hipertiroidismo.

Referencias

1. Fiske, C.H. and Subbarow, Y. (1927). The nature of the "inorganic phosphate" in voluntary muscle. *Science* 65: 401.
2. Lipmann, F. (1941). Metabolic generation and utilization of phosphate bond energy. *Advances in Enzimology* 1 : 99-162.
3. Kalckar, M. (1941). An activator of the hexokinase system. *J. Biol. Chem.* 137: 789-790.
4. Boyd, D. B. and Lipscomb, W. N. (1969). Eletronic structures for energy-rich phosphates. *J. Theor. Biol.* 25: 403-420.
5. Hill, T. L. And Morales, M.H. (1951) *J. Am. Chem. Soc.* 73, 1656-1660.
6. George, P. Witonsky, R.J. Trachtman, M. Wu, C. Dorwatr, W., Richman, L. Richman, W., Shuray, F. And Lentz, B. (1970). An enquiry into the importance of solvation effects in phosphate ester and anhydride reactions *Biochim. Biophys. Acta* 223: 1-15.
7. Hayes M. D., Kenyon, L. G. And Kollman, A. P. (1978). Theoretical calculations of the hydrolysis energies of some "high-energy" molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 100:4331-4340.
8. de Meis, L. (1984) Pyrophosphate of high and low energy. Contributions of pH, Ca, Mg and water to the free energy of hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 259, 6090-6097.
9. Williams, R. and Wolfenden, R. (1985). Solvent Water and the Biological Group-Transfer Potential of phosphoric and Carboxylic Anhydrides. *J. Amer. Chem. Soc.* 107:4345.
10. Kirby, A. J., Lima, M. F. da Silva, D. and Nome, F. (2004). Nucleophilic Attack by Oxyanions on a Phosphate Monoester Dianion: The Positive Effect of a Cationic General Acid. *J. Am. Chem. Soc.* 126(5), 1350 – 1351
11. de Meis, L., Behrens, M. I., Petretski, J. H. and Politi, M. J. (1985). Contribution of water to free energy of hydrolysis of pyrophosphate. *Biochemistry* 24(26):7783-9.
12. Romero, P. J. and de Meis, L. (1989). Role of water in the energy of hydrolysis of phosphoanhydride and phosphoester bonds. *J. Biol. Chem.*, Vol. 264, Issue 14, 7869-7873.
13. de Meis, L. (1993). The concept of energy-rich phosphate compounds: water, transport ATPases and entropic energy. *Arch. Biochem. Biophys.* 306: 287-296.
14. de Meis, L., Behrens, M. I., Celis, H., Romero, I., Gomez Puyou, M. T. and Gomez-Puyou, A. (1986). Orthophosphate-pyrophosphate exchange catalyzed by soluble and membrane-bound inorganic pyrophosphatases. Role of H⁺ gradient. *Eur J Biochem* 158(1):149-57.
15. Behrens, M. I. and de Meis L. (1985). Synthesis of pyrophosphate by chromatophores of *Rhodospirillum rubrum* in the light and by soluble yeast inorganic pyrophosphatase in water-organic solvent mixtures. *Eur J Biochem.* 152(1):221-7.
16. Boyer, P. D., Ross, R. L. And Momsen, W. (1973). A new concept for coupling in oxidative phosphorylation based on the oxygen exchange reactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:2873-2839.
17. de Meis, L. (1989) Role of water in the energy of hydrolysis of phosphate compounds. Energy transduction in biological membranes. *Biochim Biophys Acta.* 973(2):333-49.
18. de Meis, L., and A. L. Vianna (1979) Energy interconversion by the Ca²⁺-transport ATPase of sarcoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Biochem.* 48: 275-292.
19. Wilkinson, K. D. and Rose, I. A. (1979) Activation of yeast hexokinase PII. Changes in conformation and association *J. Biol. Chem.* 1979 254: 2125-2131.
20. Pedersen, P.L., and Carafoli, E. (1987) Ion Motive ATPases. I. Ubiquity, Properties and Significance to Cell Function. *Trends in Biochem. Sci.* 12, 146-150.
21. Clarke, D. M., Loo, T. W., Inesi, G. and MacLennan, D. H. (1989) Location of high affinity Ca²⁺-binding sites within the predicted transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Nature* 339(6224): 476-8.
22. Inesi, G., Cantilina, T., Yu, X., Nikic, D., Sagara, Y., Kirtley, M. E. (1992) Long-range intramolecular linked functions in activation and inhibition of SERCA ATPases. *Ann N Y Acad Sci.* 671:32-47; discussion 48.
23. Hibberd, M. G., and. Trentham, D. R. (1986). Relationships between chemical and mechanical events during muscle contraction. *Annu. Rev. Biophys. Biochem.* 15:119-161.
24. Goldman, Y. E. and Brenner, B. (1987) Special topic: molecular mechanism of muscle contraction. General introduction. *Annu Rev Physiol.* 49:629-36.
25. Goldman Y. E. (1987) Measurement of sarcomere shortening in skinned fibers from frog muscle by white light diffraction. *Biophys J.* 52(1):57-68.
26. de Meis, L., de Souza Otero, A., Martins, O. B., Alves, E. W., Inesi, G. and Nakamoto, R. (1982). Phosphorylation of sarcoplasmic reticulum ATPase by orthophosphate in the absence of Ca²⁺

- gradient. Contribution of water activity to the enthalpy and the entropy changes. *J Biol Chem.* 257(9):4993-8.
27. Moraes, V. L. and de Meis, L. (1987). ATP synthesis by the (Na⁺ + K⁺)-ATPase in the absence of an ionic gradient. Effects of organic solvent. *FEBS Lett.* 222(1):163-6.
 28. Boyer, P. D., Cross, R. L. And Momsen, W. (1973). A new concept for coupling in oxidative phosphorylation based on the oxygen exchange reactions. *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 70:2873-2839.
 29. Sakamoto, J. and Tonomura, Y. (1983). Synthesis of enzyme-bound ATP by mitochondrial soluble F1-ATPase in the presence of dimethylsulfoxide. *J Biochem (Tokyo)*. 1983 Jun;93(6):1601-14.
 30. Gómez-Puyou, A., Gómez-Puyou, M. T. and de Meis, L. (1986). Synthesis of ATP by soluble mitochondrial F1 ATPase and F1-inhibitor-protein complex in the presence of organic solvents. *Eur J Biochem.* 159(1):133-40.
 31. Cross, R.L., Cunningham, D. and Tamura, J.K. (1984). Binding change mechanism for ATP synthesis by oxidative phosphorylation and photophosphorylation. *Curr Top Cell Regul.* 24:335-44.
 32. Boyer, P. D. (1997). *Energy, Life and ATP. Nobel Lectures, Chemistry 1996-2000*, ed. Ingmar Grenthe, World Scientific Publishing Co.
 33. Lowell, B.B. and Spiegelman B.M. (2000). Towards a molecular understanding of adaptative thermogenesis. *Nature (London)* 404, 652-660.
 34. de Meis, L. (2000). ATP synthesis and heat production during Ca²⁺ efflux by sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 35-39.
 35. de Meis, L. (2001). Role of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase on heat production and thermogenesis. *Biosci. Rep.* 21, 113-137.
 36. Chinet, A. E., A. Decrouy, and P. C Even. (1993) Ca²⁺ dependent heat production under basal and near-basal conditions in the mouse soleus muscle. *J. Physiol. (Lond.)* 455: 663-678.
 37. de Meis, L. (1993). The concept of energy-rich phosphate compounds: water, transport ATPases, and entropic energy. *Arch Biochem Biophys.* 306(2):287-96.
 38. Dumonteil, E., H. Barré, and G. Meissner (1993) Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and ryanodine receptor in cold-acclimated ducklings and thermogenesis. *Am. J. Physiol.* 265 (Cell Physiol. 34): C507-C513.
 39. Dumonteil, E., H. Barré, and G. Meissner (1995) Expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport proteins in cold-acclimating ducklings. *Am. J. Physiol.* 269 (Cell Physiol. 38): C955-C960.
 40. Jansky, L. (1995) Humoral thermogenesis and its role in maintaining energy balance. *Physiol. Rev.* 75: 237-259.
 41. de Meis, L., M. L. Bianconi, and V. A. Suzano (1997). Control of energy fluxes by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase: ATP hydrolysis, ATP synthesis and heat production. *FEBS Lett.* 406: 201-204.
 42. de Meis, L. (1998). Control of heat produced during ATP hydrolysis by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in the absence of a Ca²⁺ gradient. *Biochem Biophys Res Commun.* 243(2):598-600.
 43. de Meis, L. (1998). Control of heat production by the Ca²⁺-ATPase of rabbit and trout sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* 274, C1738-C1744.
 44. Wolosker, H., Engelender, S. and de Meis, L. (1998). *Adv. Mol. Cell Biol.* 23A, 1-31.
 45. Mitidieri, F., and de Meis, L. (1999). Ca²⁺ release and heat production by the endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase of blood platelets. Effect of the platelet activating factor. *J. Biol. Chem.* 274, 28344-28350.
 46. Lowell, B. B., Spiegelman, B. M. (2000) Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature.* 404 (6778):652-60.
 47. de Meis, L. (2001). Uncoupled ATPase activity and heat production by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. Regulation by ADP. *J Biol Chem.* 276(27):25078-87.
 48. Szoke, A., Scott, W. G. And Hadju, J. (2003) Catalysis, evolution and life. *FEBS Lett.* 2003 Oct 9;553(1-2):18-20.
 49. Arruda, A. P., Da-Silva, W. S., Carvalho, D. P. and De Meis L. (2003). Hyperthyroidism increases the uncoupled ATPase activity and heat production by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Biochem J.* 375 (Pt 3):753-60.

LOS COMPUESTOS DE FOSFATO DE ALTA Y BAJA ENERGÍA

Resumen.

Los organismos vivos han desarrollado varias maneras de interconvertir a la energía en sus diversas formas, utilizando compuestos de fosfato tales como trifosfato de adenosina (ATP) como fuente biológica de intercambio de energía. Las ATPasas pueden convertir la energía derivada de la hidrólisis del ATP en trabajo. Además, una parte significativa de la energía total liberada se puede disipar en el ambiente circundante como calor. En este trabajo, repasaremos y discutiremos los procesos de transducción de energía, la noción de los compuestos de fosfato de alta y baja energía, y la evolución de dos conceptos: (i) la energía derivada de la hidrólisis de los compuestos de fosfato se libera solamente antes de la hidrólisis del enlace del fosfato y (ii) la cantidad de energía liberada y la fracción de ella que se convierta en calor varía con el ambiente, e. g., si el compuesto se encuentra en solución o en la superficie de la enzima. También discutiremos algunas evidencias que indican que las ATPasas pueden modular la conversión de la energía durante el ciclo catalítico que determina la fracción de la energía derivada del compuesto del fosfato que será convertida en trabajo y la fracción que se convertirá en calor. Este concepto es importante para la comprensión de la termogénesis y de su papel en la resistencia al frío, el control del peso corporal, y el mecanismo varias enfermedades como el hipertiroidismo y la obesidad, que se asocian con la falta de regulación de la termogénesis.

Palabras clave: adenosin trifosfato, ATP; enlaces de fosfato; ATPasa; solvatación; transducción de energía; hidrólisis del fosfato; pirofosfato; termogénesis.

Semblanza del Dr. Leopoldo de Meis.



El Dr. Leopoldo de Meis es Profesor Titular de Bioquímica Médica de la Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil. Ha recibido numerosos premios, entre los que destacan el Premio de Química otorgado por la Academia de Ciencias del tercer Mundo, el premio N. van Uden, de la Universidad de Coimbra, Portugal, además de los premios "Ordem Nacional do Mérito Científico y do Mérito Educação - Classe Grã Cruz y Classe Comendador" del gobierno brasileño. Es "Doctor Honoris Causa" por la Universidad Católica de Louvain, Bélgica y "Doctor Honoris Causa" por la Universidad de Buenos Aires, Argentina. Ha publicado más de 160 artículos de investigación, y a la fecha ha dirigido 30 tesis de maestría y 29 de doctorado. Ha sido invitado como expositor a diferentes foros científicos a lo largo del planeta y a reuniones mundiales relacionadas con el uso que debe darse a la ciencia. Ha formado parte del comité editorial de diversos libros y revistas. Una parte muy importante de su desarrollo como profesor ha sido el área docente en donde tiene publicados varios libros y artículos. Últimamente su interés por hacer atractiva y accesible la bioquímica para los alumnos de medicina y carreras afines, lo ha llevado a diseñar materiales en CD-ROM en los cuales explica, combinando la ciencia y el arte, el funcionamiento de diversas partes del metabolismo energético.