
6

Células: crisis osmótica y transducción de energía

La hipótesis de la membrana y de la célula es un fenómeno clave que, sin embargo, ha ocupado un segundo plano en esquemas sobre los orígenes en los que se propone una aparición súbita de moléculas con capacidades catalíticas y reproductivas. Así de Duvé ha imaginado un mundo precelular con un metabolismo energético avanzado basado en la química de los enlaces tioéster y en las propiedades catalíticas de pequeños péptidos no instruidos genéticamente –lo que él denomina el mundo del tioéster- que daría lugar a células dotadas de sistemas replicativos que usarían RNA. Esta visión es reminiscente de la de Eigen sobre el origen de la información genética en la que la membrana que encierra los polímeros que se reproducen es un ingrediente esencial pero tardío. El compartimento aparece al final y sólo –aunque este «sólo» en sí ya es notable- para que opere la selección natural sobre los individuos cuyo contenido genético los hace más aptos. Los polímeros autorreplicativos preceden, pues, a la membrana. Sin embargo, cualquier hipótesis creíble sobre cómo se originó la vida ha de explicar los medios por los cuales el flujo de energía se convierte en materia altamente organizada. Creo, como Harold, que esto resulta inconcebible en ausencia de compartimentos. El primero en asociar el origen de la vida al de célula fue Oparin. Luego fue seguido de muchos otros, incluso Haldane que en 1929 pensó en los virus como primera forma viva pero que 1954 escribía:

El acontecimiento crítico que mejor podríamos denominar como el origen de la vida fue la encapsulación de diferentes polímeros autorreproductivos dentro de una membrana semipermeable.

La esencia quimiosmótica de la vida

La bioquímica comparada nos ayuda a comprender el auténtico significado de los compartimentos. Si miramos las membranas celulares actuales encontramos que efectivamente definen individualidades. Sirven de frontera para establecer la dicotomía interior-exterior, una de las esencias del ser vivo. Pero desde los años sesenta tenemos una percepción más profunda del significado de la membrana. Ésta no es una simple barrera física de separación. *La célula es la unidad elemental de las transformaciones bioenergéticas y las membranas son protagonistas esenciales de estos procesos.* En 1961 P. Mitchell, del Instituto Glynn en Bodmin, inició la era *quimiosmótica* de la bioquímica. Hasta entonces se tenía una idea muy pobre de los mecanismos implicados en las transacciones energéticas en los seres vivos. La célula era, literalmente, un saco de enzimas. Para O. Warburg, un pionero del desarrollo de la bioquímica, esta ciencia acababa donde empezaba la estructura celular. Sin embargo, la teoría quimiosmótica de Mitchell, que ha salido airosa del meticuloso escrutinio experimental a la que se ha visto sometida durante más de tres décadas, permite explicar un sinnúmero de procesos metabólicos introduciendo el concepto de *metabolismo vectorial*. En otras palabras, el transporte de sustancias a través de membranas, el que una reacción ocurra a un lado u otro de la membrana, la acumulación o expulsión de iones, pasan a ser protagonistas del metabolismo energético.

Los fundamentos de la teoría quimiosmótica son muy simples (véase figura 9). 1) Las *membranas transductoras de energía* definen *compartimentos cerrados* de forma que a su través se pueden mantener diferencias de potencial eléctrico y de concentración de protones y/o sodio -en lenguaje químico, *gradientes de potencial electroquímico del ion*. 2) Estos gradientes son el resultado de la acción de *enzimas capaces de bombear los iones* en contra de su potencial -como cuando se da cuerda a un reloj-; los gradientes electroquímicos generados son almacenes de energía derivados de fuentes primarias como la luz visible o la energía desprendida en reacciones de oxidación-reducción; a veces se usa una fuente energética secundaria o derivada del metabolismo, como el ATP. 3) La membrana también alberga al menos un *sistema disipador de la energía*; el regreso de los iones a favor del potencial electroquímico -como la caída de agua en una presa hidroeléctrica- permite el acoplamiento a procesos diversos: biosíntesis, movimiento del flagelo bacteriano, generación de calor, acumulación o extrusión de sustancias, e incluso la transmisión de información.

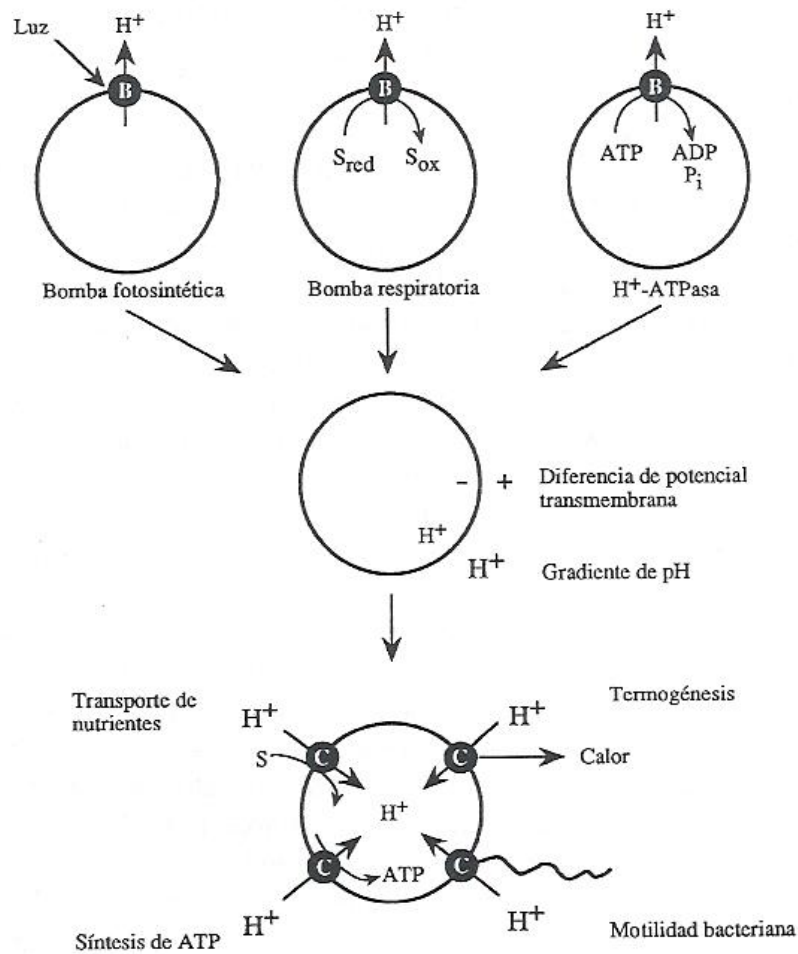


Figura 9. Fundamentos de la circulación quimiosmótica de los protones. los sistemas bombecedores de protones (B) generan un potencial protónico (una diferencia de potencial transmembrana y un gradiente de pH) que es disipado por los consumidores (C) para impulsar diversos procesos como la síntesis de ATP, el transporte de sustratos, la motilidad o la generación de calor.

La esencia de un sistema quimiosmótico es el establecimiento de un recinto cerrado mediante una biomembrana aislante. Explorando las células actuales nos encontramos con que los circuitos quimiosmóticos son ubicuos. No se conocen excepciones en nuestra biosfera. Fotótrofos, termófilos, fermentadores, quimiotrofos, heterótrofos, unicelulares, alcalófilos, respiradores de oxígeno o de sulfato, metanogénicos, autótrofos o pluricelulares, todos dependemos, inevitable y obligatoriamente, de la transducción quimiosmótica de la energía.

Si se detiene la circulación iónica sobreviene la muerte. Todas las membranas plasmáticas -procarióticas o eucarióticas- son transductoras de energía. Dentro de una célula eucariótica las membranas de los lisosomas y vacuolas, y quizás del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi, también lo son. Por supuesto, la membrana interna mitocondrial y la membrana tilacoidal de los cloroplastos establecen circuitos quimiosmóticos. En las bacterias con dos membranas -Gram negativas- la externa no reúne las características de permeabilidad adecuadas para ser una membrana transductora de energía. Ocurre lo mismo con las membranas de las envolturas externas de cloroplastos y mitocondrias.

El carácter universal de la transducción quimiosmótica de la energía sólo es comparable al de procesos metabólicos como la replicación o la traducción de la información genética. O el uso de compuestos fosforilados en el metabolismo. Los textos de bioquímica ponen mucho énfasis en el papel del ATP como moneda universal de intercambio de energía. Ésta es, sin duda, una visión prequimiosmótica. La conexión entre las fuentes de energía externas y las necesidades celulares, incluyendo la síntesis de ATP, se efectúa mediante la circulación quimiosmótica de los protones o del sodio. En el caso que el ATP sea la única conexión con la energía exterior, a través de las fermentaciones, los gradientes iónicos todavía son esenciales para ciertas tareas que demandan energía, como la incorporación del sustrato fermentable o la excreción del exceso de ácido producido. En realidad todas las células conocidas hasta hoy disponen de al menos dos monedas convertibles de energía metabólica, una soluble -el ATP- y otra asociada a membrana- el gradiente electroquímico de protones y/o sodio (figura 10). Todas las necesidades energéticas de la célula quedan satisfechas si por lo menos la formación de una de las monedas energéticas mencionadas se efectúa a expensas de una fuente energética externa -luz o energía química. Como ha reconocido V. P. Skulachev de la Universidad Estatal de Moscú, estas generalizaciones constituyen los principios básicos y universales de la bioenergética, mientras la exploración de la biosfera no nos suministre alguna excepción. Principios básicos, universales y antiguos.

Bombea o revienta

F. G. Donnan demostró que la existencia de especies iónicas incapaces de atravesar una membrana semipermeable que los encierra, como los biopolímeros, tiene como consecuencia inevitable el desequilibrio osmótico

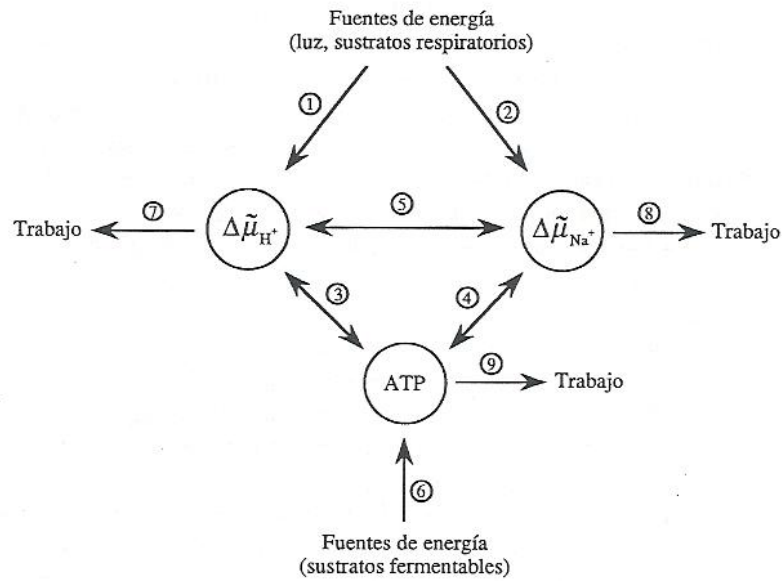


Figura 10. Todas las células usan dos monedas convertibles de energía metabólica: una soluble (ATP) y otra asociada a membrana (gradiente de potencial electroquímico de protones y/o sodio).

1. Utilización de fuentes de energía (luz o sustratos respiratorios) por los generadores de $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ fotosintéticos o respiratorios a la bacteriorododopsina.
2. Utilización de sustratos respiratorios y sustratos de descarboxilasas generadoras de $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$.
3. Interconversión $\Delta\tilde{\mu}_{H^+} \leftrightarrow$ ATP catalizada por H^+ -ATP sintasa (H^+ -ATPasa).
4. Interconversión $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+} \leftrightarrow$ ATP catalizada por Na^+ -ATP sintasa (Na^+ -ATPasa).
5. Interconversión $\Delta\tilde{\mu}_{H^+} \leftrightarrow \Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$ catalizada por el antiportador Na^+/H^+ .
6. Formación de ATP por fosforilación a nivel de sustrato (glicólisis, descarboxilación oxidativa)
- 7,8,9. Trabajo químico, osmótico o mecánico impulsado por $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, $\Delta\tilde{\mu}_{Na^+}$ y ATP, respectivamente.

Adaptado de V. P. Skulachev (1992): «Chemiosmotic systems and the basic principles of cell energetics», L. Ernster (ed.): *Molecular Mechanisms in Bioenergetics*, Amsterdam, Elsevier, cap. 2, pp. 37-73.

y la entrada de agua al compartimento. La evolución ha contrarrestado de diversas formas la tendencia natural de una célula a hincharse. En las células vegetales, los hongos y los procariontes -excepto los micoplasmas- la dificultad está mitigada principalmente por la existencia de una pared celular. Esta estructura formada por un entramado de polímeros especializados actúa de muro de contención de la célula. En algunos eucariontes unicelulares -por ejemplo *Paramecium*- existen sistemas de excreción de agua. Las células animales han escogido la vía de excluir selectivamente algunos iones, como el sodio, para hacer frente al problema. Se restablece el equilibrio osmótico de la célula expulsando cloruro sódico constantemente: el catión sodio es bombeado mientras que el cloruro sale de la célula impulsado por la diferencia de potencial eléctrico negativo en el interior. Al mismo tiempo se reserva al catión potasio la tarea de compensar las cargas negativas de los biopolímeros. La importancia metabólica de este fenómeno se ve iluminada por el hecho de que el enzima encargado de esta función en células animales -la ATPasa bombeara de sodio y de potasio- consume una parte muy significativa del presupuesto energético de la célula -un 30 por ciento del ATP. Si se inhibe esta actividad la célula se hincha y puede llegar a reventar. Evitar la explosión celular como consecuencia del efecto Donnan es un problema clave y persistente en todo tipo de organismo a lo largo de toda su vida. Si aplicamos el principio de continuidad llegaremos a la conclusión de que esta dificultad existe desde que existen las células, por muy primitivas que las imaginemos.

Protocélulas con protoproblemas

Se han sugerido modelos de organización precelular muy variados. Algunos como los coacervados de Oparin o las microesferas de proteínoides de Fox ya no se suelen considerar como modelos adecuados de las células más primitivas. La razón fundamental es porque su parecido con las células es puramente superficial, morfológico. Los coacervados o agregados coloidales y las esferillas formadas a partir de polímeros térmicos no guardan ninguna relación con las células en cuanto a estructura o composición. Sería muy difícil que realmente representaran estadios evolutivos con el potencial de convertirse en protocélulas.

D. Deamer, de la Universidad de California en Davis, y Oró han argumentado extensamente a favor de los liposomas o vesículas con una membrana hecha de dos capas de sustancias lipídicas. Las moléculas

anfifílicas que pueden formar las mencionadas vesículas no sólo se sintetizan en el laboratorio en condiciones prebióticas plausibles sino que se han encontrado en el meteorito de Murchison. Deamer extrajo a partir de muestras del meteorito un material de tipo lipídico que espontáneamente formó gotitas rodeadas de membrana.

Supongamos que una protocélula se forma cuando un liposoma captura en su interior algún polímero replicativo. Inmediatamente ocurrirá la crisis osmótica y la célula explotará. Este efecto Donnan *ab initio* ha de resolverse si queremos que el sistema sea estable. Una pared requiere la evolución de sistemas de biosíntesis, de exportación de materiales al lugar de construcción y de mantenimiento, algo muy complicado para ser considerado como una solución primitiva. El bombeo de iones es sin duda la alternativa más sencilla.

¿Cuál sería el ion escogido? El sodio es el mejor candidato dada su abundancia natural. Si la membrana se mantiene poco permeable al sodio se reducirá el consumo energético necesario para mantener una concentración interna baja. La asimetría universal observada en la distribución celular de sodio y potasio quizás sea un legado de la regulación ancestral del volumen celular. En diferentes linajes evolutivos se pueden haber añadido invenciones más sofisticadas como la rigidez de una pared. Pero las estructuras y funciones celulares se habrían originado y desarrollado en un caldo rico en potasio y pobre en sodio. El requerimiento absoluto por el potasio de maquinarias metabólicas tan centrales como los ribosomas nos está diciendo que la acumulación selectiva de potasio pudo preceder la invención de la traducción.

¿Qué tipo de bomba de sodio? Se conocen ATPasas bombeadoras de sodio en bacterias, diferentes en mecanismo y estructura a la bomba de sodio de las células animales pero muy similares a las ATPasas que bombean protones en bacterias. La mayoría de los autores piensan que se trata de antiguas ATPasas bombeadoras de protones adaptadas a usar sodio. Hay otras rutas alternativas para el bombeo de sodio. En bacterias generalmente la circulación del protón lleva el peso de la transformación de la energía luminosa o química en ATP, motilidad o acumulación de nutrientes. La circulación del sodio tiene funciones adicionales en la transducción de señales o en la regulación del pH intracelular y del contenido iónico. Pero existe además un «mundo del sodio». Bacterias alcalófilas, marinas o halófilas pueden basar su bioenergética, total o parcialmente, en la generación y consumo de un gradiente de potencial electroquímico de sodio. Una actividad clave en la circulación de este ion

es el antiportador de protones y sodio. Se denomina así porque normalmente transporta un protón y un catión sodio en direcciones opuestas. Permite a las bacterias expulsar sodio a expensas del potencial protónico generado y mantenido por una bomba de protones -que puede ser una ATPasa o una cadena de transporte electrónico respiratoria o fotosintética. Los antiportadores de sodio y protones son proteínas de membrana ubicuas. Se encuentran en las membranas plasmáticas y de orgánulos de células de plantas y animales, de hongos y algas, etc.

En conclusión, bastaría con una o dos entidades físicas en la membrana, una bomba de sodio o una bomba de protones y un antiportador de protones y sodio, para afrontar la crisis osmótica derivada del efecto Donnan. La segunda opción es más versátil y ya fue sugerida en 1976 por T. H. Wilson y P.C. Maloney, de la Universidad de Harvard. Según su hipótesis el ATP generado por fermentación sería la fuente de energía para sostener la circulación de protones. J.A. Raven de la Universidad de Dundee y F.A. Smith de la Universidad de Adelaida propusieron el mismo año que la función original de la ATPasa de membrana sería bombear el exceso de protones generado por los productos de la fermentación. El carácter primordial de la circulación de los protones viene apoyado por los estudios filogenéticos que mencionamos a continuación.

Las ATPasas bombeadoras de protones son antiguas

En los orgánulos energéticos eucarióticos -mitocondrias y cloroplastos- se encuentran las ATPasas de tipo F Y que en condiciones fisiológicas actúan sintetizando ATP. También las hay en la membrana celular de las bacterias. En este caso consumen o sintetizan ATP según si las condiciones fisiológicas las obligan a funcionar generando o consumiendo potencial protónico, respectivamente. Se conocen también las ATPasas bombeadoras de protones tipo V emparentadas con las de tipo F y que se encuentran en las membranas internas eucarióticas -vacuolas, lisosomas. En la membrana plasmática de arqueobacterias se ha encontrado una ATPasa bombeadora de protones que guarda un grado de similitud extraordinario con las ATPasas tipo V eucarióticas. Cuando se compara la estructura primaria de los polipéptidos que las componen alrededor del 50 por ciento de los aminoácidos ocupan posiciones idénticas. Sin embargo, la función y la estructura del enzima de arqueobacterias lo acercan mucho más al de tipo F de la membrana bacteriana. Se ha propuesto llamarle ATPasa tipo A. El carácter universal y la notable conservación evolutiva de

estas bombas tipo F, V y A permiten construir hipótesis sobre las bifurcaciones más profundas de los árboles filogenéticos y especular sobre las características del ancestro universal. J.P. Gogarten, de la Universidad de Connecticut en Storrs, y L. Taiz, de la Universidad de California en Santa Cruz, han construido dichos árboles y han concluido que la generación y mantenimiento de un potencial protónico por una ATPasa localizada en la membrana es, en efecto, un rasgo primitivo, presente ya en el ancestro común a todas las formas de vida actuales. Esto quiere decir que es al menos tan antiguo como el uso del DNA como material genético o de los ribosomas como factorías de proteínas. Si no anterior.

En bacterias fotosintéticas y en membranas internas eucarióticas se ha descrito un enzima que acopla la hidrólisis de pirofosfato al bombeo de protones. Su función en las bacterias fotosintéticas consiste en almacenar la energía del gradiente de potencial electroquímico de protones en forma de pirofosfato. En la oscuridad, la hidrólisis del pirofosfato mantendrá el potencial protónico. La pirofosfatasa, como la ATPasa bombeadora de protones, tiene pues una función de suplencia de la bomba fotosintética. Esta no es la única semejanza del pirofosfato con el ATP. El pirofosfato también es un dador de fosfato eficiente, por ejemplo fosforilando proteínas. H. Baltscheffsky de la Universidad de Estocolmo ha señalado que junto a las funciones metabólicas anteriores hay otras observaciones que hacen geoquímicamente plausible que el pirofosfato precediera al ATP como moneda de intercambio energético entre los gradientes de protones y el metabolismo. Existe un mineral, la canafita, que contiene pirofosfato y además se produce pirofosfato en el gas volcánico o en sistemas modelo que tratan de simular las condiciones magmáticas. Otros autores como de Duve o T. Cavalier-Smith, de la Universidad de Columbia Británica en Vancouver, también han incorporado pirofosfatasas bombeadoras de protones a sus esquemas de células primitivas.

Otras bombas de protones

En las membranas celulares procarióticas el bombeo de protones lo pueden ejercer sistemas diferentes a las ATPasas. Los generadores primarios de potencial protónico son fotosintéticos o respiratorios según la naturaleza de la energía que los impulsa.

La esencia de un centro de reacción fotosintético es muy simple. Una molécula capaz de absorber fotones de luz visible, como la clorofila, se

halla unida a una proteína que tiene una localización precisa dentro de una membrana. Cuando una molécula absorbe un fotón de energía adecuada algún electrón de su estructura sube a niveles energéticos superiores. Se dice que la molécula se excita. El fenómeno siguiente depende del ambiente en el que se encuentre dicha molécula. La energía se puede perder en forma de calor o en forma de radiación, mediante el fenómeno de la fluorescencia. El secreto de la fotosíntesis es que todo está dispuesto de tal manera que existe un acontecimiento mucho más rápido que los anteriores: el electrón «excitado» es cedido de la clorofila a una molécula vecina en una billonésima de segundo. Es sin duda el proceso químico más rápido que ocurre en la biosfera. La separación de cargas se consume porque hay un encadenamiento de moléculas que toman y ceden el electrón alejándolo cada vez más del pigmento de donde salió. Pero hay un detalle fundamental. Todas estas moléculas se disponen en el espacio de tal forma que la separación de cargas ocurre casi perpendicular al plano de la membrana generando una diferencia de potencial eléctrico. La conversión de la energía luminosa en diferencia de potencial eléctrico a través de una membrana constituye un ejemplo excepcional de metabolismo vectorial.

Un enzima presente en todo tipo de cadenas de transporte electrónico, cubriendo el tramo intermedio de potenciales de reducción, es el complejo citocromo *bc₁/b₆f*. Este complejo proteico de membrana cataliza la transferencia de electrones entre las quinonas reducidas -sustancias libremente móviles en la membrana- y unas proteínas de pequeño tamaño y localización periférica -es decir, sobre la superficie de la membrana. Esta proteína periférica es un citocromo tipo c en bacterias y mitocondrias, mientras que en los cloroplastos es la plastocianina. La energía liberada por la transferencia de electrones desde las quinonas hasta el citocromo c o la plastocianina se conserva, en parte, como potencial protónico ya que el complejo citocromo *bc₁/b₆f* cataliza simultáneamente la reacción redox y el paso de protones de un lado a otro de la membrana. Estos complejos muestran una distribución filogenética muy extensa. Que se pueda considerar como una invención idiosincrática de bacterias o no dependerá de si se llega a encontrar entre las arqueobacterias. En este caso se podrá predecir que de este complejo enzimático deberían quedar rastros en la membrana plasmática y/o en las endomembranas de las células eucarióticas, al menos en aquellos organismos unicelulares que han retenido rasgos más primitivos como *Diplomonas* o *Microsporidia*.

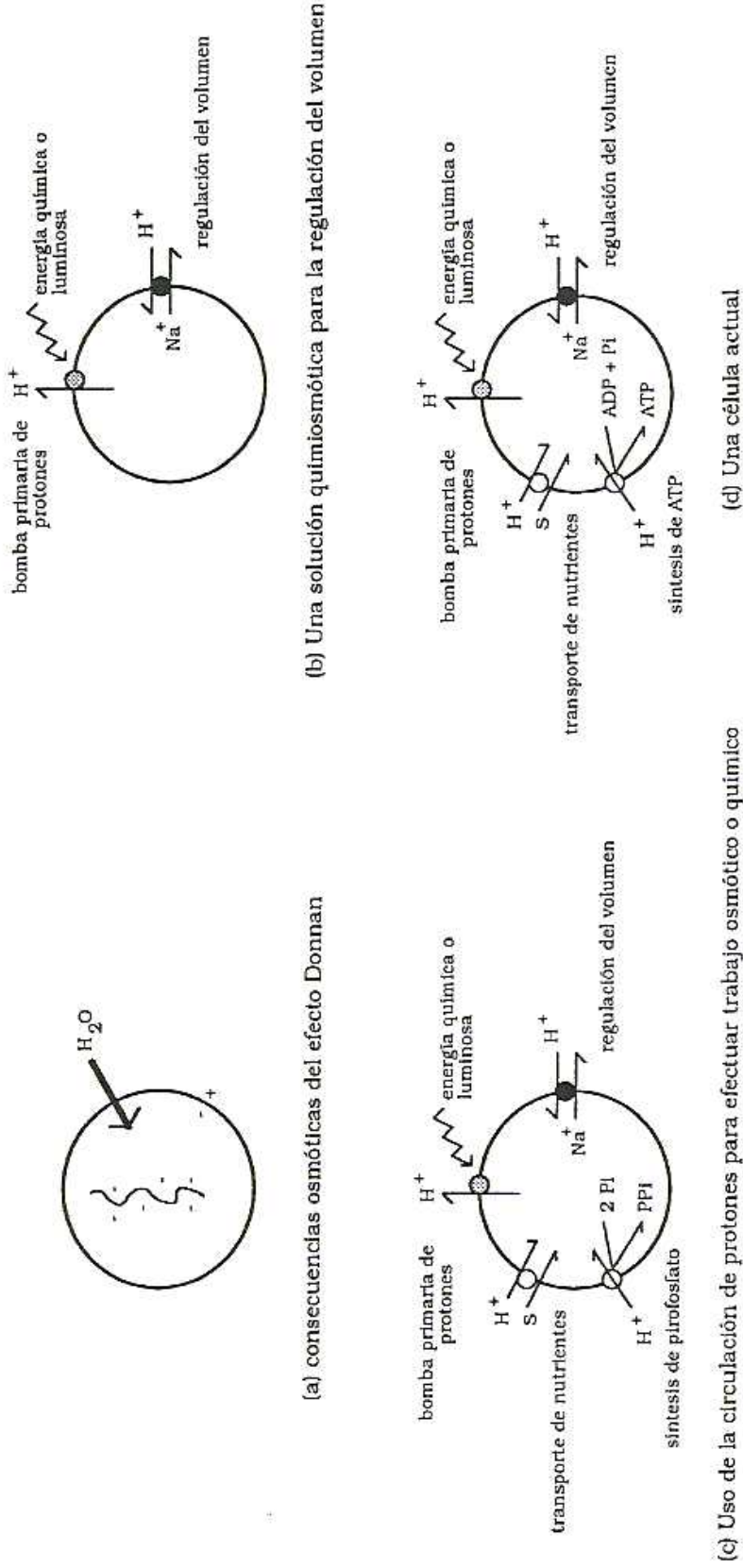


Figura 11. El efecto Donnan *ab initio* y los posteriores oportunismos evolutivos

Circulación quimiosmótica protocelular

Recordemos que hemos invocado el origen de la circulación iónica para resolver un problema físico de hinchamiento que se le planteó a la primera célula, independientemente de todo tipo de consideraciones sobre los orígenes del metabolismo y del material genético. Esta visión exige pues la coevolución del compartimento y de los elementos que establecen el circuito quimiosmótico.

En su versión mínima la expulsión de sodio la ejercería una ATPasa bombeadora de este catión. Esta posibilidad no está apoyada por los estudios de filogenias moleculares que apuntan hacia el carácter ancestral del bombeo de protones y teniendo en cuenta que las ATPasas bombeadoras de sodio parecen más bien adaptaciones recientes. Esta propuesta tampoco soluciona el problema de la regulación del pH intracelular.

Una segunda versión contempla la acción concertada de una bomba de protones y un intercambiador de protones y de sodio, tal y como se esquematiza en la figura 11 (b). La bomba puede depender del metabolismo intermediario -si consume ATP o pirofosfato- como proponen Wilson y Maloney, Raven y Smith y de Duve. Pero puede estar impulsada por una fuente de energía primaria, sea energía química redox o luz. Un enzima antecesor del complejo de citocromo *bc₁/b₆f* catalizando la oxidación de materiales orgánicos primordiales podría bombear protones. Cavalier-Smith ha propuesto que las células más primitivas serían fotoheterotróficas. Es decir, usarían luz para la síntesis de pirofosfato mediante un sistema quimiosmótico sencillo (figura 7c) pero dependerían de materia orgánica prebiótica. H. J. Morowitz de la Universidad George Mason en Virginia ha imaginado que la generación espontánea de liposomas a partir de materiales prebióticos -de origen terrestre o extraterrestre- y la incorporación de pigmentos sensibles a la luz visible podría ser el primer paso en la biogénesis. El gradiente de potencial eléctrico generado sería el motor de un metabolismo primordial que daría lugar a la maquinaria genética. Su propuesta básica es que podemos reconstruir la biogénesis a través del estudio del metabolismo de las células actuales. En el próximo capítulo analizamos algunas de las posibilidades y limitaciones de la bioquímica comparada.