

ALGUNOS HILOS DEL RICO ENTRAMADO **HISTORICO DE LA BIOQUÍMICA***

Luis Acerenza
Sección Biofísica
Departamento de Biología Celular y Molecular
Instituto de Biología, Facultad de Ciencias

Introducción.

La historia de la Bioquímica, como casi todas las historias, implica muchas historias ricamente entrelazadas. Sería muy difícil tratar de incursionar en todas ellas, y más aún en todos los eventos que han tenido consecuencias fecundas. Es por esta razón que sólo voy a considerar algunos de los hilos de eventos dentro de su rico entramado.

Algunas de las historias de los descubrimientos fundamentales de las que se compone la historia de la Bioquímica son:

- i) la historia de la composición de los organismos vivientes,
- ii) la historia de la estructura de las macromoléculas,
- iii) la historia de la función de las macromoléculas,
- iv) la historia de los mecanismos subyacentes a los procesos y
- v) la historia de la dinámica de los procesos.

La primera de ellas es la historia del descubrimiento de la composición química de los seres vivos. Estos poseen compuestos químicos que los caracterizan y que, esquemáticamente hablando, son de dos tipos: compuestos orgánicos pequeños y macromoléculas. Los primeros están estrechamente vinculados con el desarrollo conceptual y metodológico de la Química Orgánica. Dedicaremos algún espacio a su estudio ya que es un tema históricamente relevante porque forma parte de los orígenes y la propia definición de la Bioquímica. Por otro lado, están las macromoléculas, que han sido denominadas “moléculas biológicas”, que incluyen proteínas, ácidos nucleicos, etc.. Asociadas con estas especies químicas de gran talla hay variados relatos históricos fascinantes acerca de la dilucidación de su estructura y su función. La función de las macromoléculas está, obviamente, estrechamente ligada a su estructura. Por ende, los eventos que llevaron al descubrimiento de estructura y función tienen una enorme cantidad de puntos en común y en cierta medida la cabal comprensión de unos requiere cierto entendimiento de los otros. Sin embargo, a los efectos de este limitado estudio, vamos a desglosarlas y nos dedicaremos fundamentalmente a los aspectos funcionales. Desde el punto de vista actual, dominado por las descripciones moleculares de los fenómenos biológicos, las funciones biológicas no pueden ser explicadas si no se involucra algún tipo de macromolécula y su función. Dentro de la historia de la función de las macromoléculas, que es muy vasta, solamente daré una pequeña perspectiva de lo que es el tema de la catálisis (en particular de la catálisis enzimática), o sea la capacidad de algunas macromoléculas de modificar la velocidad de los procesos celulares.

En el concierto del funcionamiento celular, las moléculas orgánicas pequeñas son transformadas según secuencias intrincadas de reacciones químicas, siendo la dinámica y el control de estos procesos temporales y especiales “guiados” por macromoléculas. Así como existe una historia de los descubrimientos de la estructura y de la función de las macromoléculas, también hay una de la

* Versión corregida por el autor.

estructura (la composición y estequiometría) y de la función (su dinámica y control) de los procesos bioquímicos. Aquí, haremos especial mención al descubrimiento de los procesos de fermentación y respiración. Con respecto a los aspectos funcionales, veremos que la extensión de los conceptos de la catálisis enzimática a los sistemas multienzimáticos resultó un desafío considerable.

Es interesante notar que la sucesión de los descubrimientos científicos que vamos a describir ha seguido históricamente un orden, *grosso modo*, de complejidad creciente (moléculas orgánicas pequeñas, macromoléculas, transformaciones de moléculas, efecto de las macromoléculas en las transformaciones). Esto tiene como primera consecuencia que las historias de los descubrimientos vinculados a niveles de organización superiores tienen como “componentes” las historias anteriores, que a su vez tienen sus propios “componentes”. De este punto de vista, para entender la historia de una disciplina como la Bioquímica no es suficiente hacer un estudio lineal de los eventos, sino que se requiere abordar lo que podría denominarse como una jerarquía de niveles de organización históricos. Por otra parte, el hecho de que los descubrimientos hayan seguido el orden de complejidad creciente, hace que exista una estrecha coincidencia entre el orden de la historia de los descubrimientos y el orden que, según algunas teorías actuales, siguió la evolución química prebiótica que desembocó en el surgimiento de la vida. Esta coincidencia nos hace reflexionar acerca de la influencia que podría tener la historia en las concepciones de las que están embebidas algunas teorías científicas, en este caso particular, del origen de la vida.

La descripción que haremos consistirá en el estudio de dos etapas. La primera etapa involucra el abordaje de estos temas históricos hasta el año 1900, para poder diagnosticar cual era el estado del conocimiento en ese momento. La segunda etapa cubrirá desde 1900 hacia adelante, para ver como de esa situación se llega a la actual. Por situación actual entendemos la de hace 20 años. Aunque mis conocimientos de historia, en cuanto a la ciencia de la Historia, son muy restringidos, he observado que en general los historiadores, cuando hacen un estudio, tratan de no llegar hasta el día de hoy. Lo ocurrido en el pasado reciente no puede verse en perspectiva, ni tampoco pueden constatarse las consecuencias de estos eventos a mediano y largo plazo. Puede suceder que un descubrimiento que hoy nos deslumbra, quizá dentro de 20 años veamos que no tenía la jerarquía o la relevancia que pensábamos que tenía. Entonces por eso voy a mantener la cautela que veo que tienen los que han abordado estos temas en forma más profesional, y voy a acercarme no más que a principios de la década de los años 1980.

I-La situación hasta 1900.

Establecimiento de que existen procesos químicos en los seres vivos.

Lo primero importante, en la historia de la composición de los organismos, es la circunstancia en la que se llegó a la conclusión de que en los seres vivos ocurren procesos químicos. Esta es una historia bastante antigua y, como muchas otras, comienza con la nutrición y en particular con el fenómeno de la digestión. Ya por la época en que Newton estaba haciendo sus grandes hallazgos, se postula que la digestión es un proceso químico y no simplemente una mezcla mecánica. Previo a los estudios de Van Helmont (1577-1644), existía la idea de que la digestión era más bien un proceso de mezclado, un proceso mecánico, pero algunos estudios preliminares de este médico lo hacen llegar a la conclusión de que es fundamentalmente un proceso químico.

En el año 1752, Réaumur, un naturalista químico-físico que además es considerado uno de los padres de la siderúrgica como ciencia, hace un experimento en el que usa aves de rapiña. Las aves de rapiña, al digerir sus presas, sacan hacia el exterior todo aquello que no es digerible. Este investigador les suministró a las aves cápsulas de hierro con pequeñas perforaciones y alimentos en su interior. El ave de rapiña ingiere y digiere el alimento y expulsa la cápsula de hierro que no es capaz de digerir. Entonces lo que él ve es que para muy distintos tipos de sustancias existe un alto grado de disolución y concluye que el jugo gástrico posee un gran poder disolvente. Obviamente como estas cápsulas eran de hierro, lo que las hacía rígidas, y muy pequeñas, no puede haber habido allí un efecto mecánico apreciable sobre los alimentos.

Spallanzani, en el año 1783, repite esos experimentos, los confirma y luego ve que muchos otros animales incluyendo al hombre, tienen un jugo gástrico con poder de acción química muy fuerte sobre los alimentos.

Estudio de la composición química de los seres vivos.

Una vez que se reconoce que existe una Química en los seres vivos, obviamente los químicos entran a jugar en el escenario y el desafío es determinar la composición química de los seres vivos. Pasemos ahora entonces a la Química de los organismos, que no es la Química orgánica actual, y que podría considerarse como la prehistoria de la Bioquímica.

Scheele, un químico muy destacado, logra aislar (entre 1770 y 1786) ácido cítrico a partir del limón, ácido láctico a partir de leche agria, ácido málico a partir de manzanas, ácido tartárico a partir de vino, ácido úrico a partir de orina, y glicerina calentando grasas animales y vegetales. A partir de este momento se empiezan a aislar una gran cantidad de compuestos orgánicos. En el año 1773, el químico Rovellet aísla urea a partir de orina, un compuesto que resultará muy importante en esta historia.

Un famoso médico y químico sueco llamado Berzelius, a quién se le debe, entre otras cosas, la notación de los elementos que se utiliza actualmente, y muchos otros aportes no solo de notación sino también conceptuales de la Química, definió en el año 1806 a la Química orgánica. En sus palabras: “La parte de la Fisiología que describe la composición de los organismos vivos y los procesos químicos que en ellos acontecen, se denomina Química orgánica.” Él tenía una visión vitalista de lo que era la Química orgánica. Las ideas de ese momento y que Berzelius compartía, consistían en que la Química inorgánica era la química del laboratorio donde se podían sintetizar sustancias, y que la Química orgánica era la química de los seres vivos, cuyas sustancias sólo un sistema biológico las podía sintetizar. De acuerdo a esta concepción, no era posible crear compuestos orgánicos mediante la síntesis de laboratorio a partir de compuestos inorgánicos, o sea, la Química inorgánica pertenecía a mundo y la Química orgánica a otro.

Obviamente con la visión de Berzelius la Química orgánica, como Química, no tenía chance de avanzar demasiado, porque como su síntesis pertenecía exclusivamente a los organismos estaba ajena al laboratorio. Esto resultó una traba al desarrollo de los procesos orgánicos de síntesis y al estudio de las reacciones orgánicas.

Síntesis de los compuestos de los seres vivos.

En el año 1828 ocurre un hallazgo que abre una nueva etapa en la historia de los compuestos orgánicos, y que puede considerarse como el nacimiento de la Química orgánica moderna. Este hallazgo se debe al químico Wöhler. Lo que él quería no era sintetizar un compuesto orgánico, tal como se concebía en su época, sino simplemente quería tomar dos compuestos inorgánicos, cianato de plomo $[Pb(OCN)_2]$ y amoníaco $[NH_3]$, para formar un tercer compuesto inorgánico, cianato de amonio $[NH_4OCN]$, el que obtuvo al hacer la combinación. Luego aplicó otro procedimiento, que aún hoy es usado, que es hervir la solución y eliminar el agua de forma de promover la cristalización. Pero en este caso, al hervir para cristalizar lo que él quería obtener, que era el cianato de amonio, hubo una reacción química, una reacción orgánica (un rearrreglo) y obtuvo urea $[(NH_2)_2CO]$.



Entonces sin buscarlo, por una situación completamente accidental, Wöhler logra sintetizar y reconocer un compuesto orgánico, sintetizado a partir de dos sustancias inorgánicas. Este hecho abre un fecundo camino de síntesis orgánica. En el año 1845, el químico inorgánico Kolbe sintetiza el ácido acético.

Pero el hallazgo de Wöhler al principio no fue generalmente aceptado. A él y a los que lo siguieron les costó muchísimo convencer a la comunidad, de que realmente los compuestos orgánicos no eran mucho más que los inorgánicos, en cuanto a su síntesis. 30 años después de la síntesis de urea en el laboratorio (en 1859), Kekulé, un famoso químico que inicialmente fue estudiante de arquitectura y luego cambió de vocación dedicándose a la Química, dijo: “Hemos llegado a la convicción de que... no existe diferencia entre compuestos inorgánicos y compuestos orgánicos... Definimos, por tanto, la Química orgánica como la Química de los compuestos del carbono...” O sea que a 30 años de la síntesis de Wöhler estaba bien establecido que la Química orgánica no tenía una diferencia sustancial con la Química inorgánica.

En suma, antes de llegar al año 1900 ya había una Química orgánica bien definida y establecida.

Catálisis.

La mayor parte de los hallazgos que aquí mencionamos se refieren a experimentos que fueron determinantes en cambiar la concepción imperante en el momento. Pero es importante destacar que hay toda una historia previa antes que un concepto o idea se fije, donde se manejaron conceptos parecidos, pero en general imprecisos o con fundamento insuficiente. Estas etapas preparatorias a los grandes descubrimientos permiten, sin embargo, entender un poco mejor los caminos que llevaron a las grandes transformaciones científicas.

Entre los primeros hallazgos relacionados con la catálisis hay algunos experimentos interesantes. El físico y químico Kirchoff, en el año 1812, logra catalizar el pasaje de almidón a glucosa poniendo ácido diluido, donde ve que el ácido no se consume en la reacción ni se altera. Un poco después (1817-1823) el químico Dobereiner logra la transformación de hidrógeno (H_2) y oxígeno (O_2) en agua (H_2O), poniendo esponja de platino (platino con una estructura que tiene una gran superficie relativa al volumen), y ve que el platino no sufre cambios apreciables, no participa en la reacción.

Berzelius, quién era un químico muy influyente, da una definición de catálisis, más aún es el que introduce el término catalizador, en el año 1835. Él dice: "...La fuerza catalítica consiste esencialmente en el hecho de que las sustancias pueden desencadenar afinidades que están en estado latente, a una temperatura dada, y lo hacen no por su propia afinidad sino por su sola presencia." Como vemos su descripción tiene un formato vitalista; él mantiene este enfoque a pesar de que ya había sido realizada la síntesis de urea por Wöhler. Es muy criticado por esta definición; se lo ataca con el argumento que es una definición vaga y basada en ideas vitalistas.

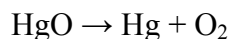
Recién Ostwald (1853-1932), un químico de la segunda mitad del siglo XIX, propone la definición de catalizador como hoy se entiende: los catalizadores son sustancias que afectan la velocidad de las reacciones químicas sin participar del balance global de la reacción. Por lo tanto, ya en la segunda mitad del siglo XIX existía una definición clara y precisa de lo que es la catálisis química.

Brown, quien vivía en el Reino Unido y era un amante de la cerveza, era el profesor de Malting y Brewing, que son los procesos que se usan para la fabricación de la misma. En el año 1872, estudiando levaduras intactas, es el primero que sugiere que el proceso de fermentación alcohólica que ocurre en presencia de levadura se da a partir de un complejo "enzima"-sustrato. Luego Buchner, en el año 1897, demuestra que puede haber fermentación sin levadura. Brown, al tomar conocimiento de los trabajos de Buchner, ya no utiliza más las levaduras, sino una enzima purificada, que es la invertasa (enzima que degrada la sacarosa en glucosa y fructosa). En el año 1902 obtiene curvas de saturación, en las cuales al aumentar la concentración de sacarosa, la velocidad no aumenta en forma proporcional, sino que la pendiente va cayendo. Estas curvas de saturación las explica por la presencia de un complejo enzima-sustrato.

Henri, quien cita el trabajo de Brown en el suyo, formula en los años 1902-1903, la idea del complejo enzima-sustrato, pero en términos de un modelo cuantitativo, y es el primero en describir lo que hoy se llama la ecuación de Michaelis-Menten de la cinética enzimática.

El proceso de la respiración.

Pasemos ahora a hablar de los procesos, y primeramente de los procesos de respiración. Un teólogo británico llamado Priestley (1733-1804), que también se dedicó a la Química porque era muy buen experimentador, entre otras cosas, demostró que las plantas verdes convierten "aire respirado" en "aire respirable". Sintetiza el oxígeno en el año 1774, para lo cual con un lente hace incidir un rayo de luz sobre óxido de mercurio (HgO), logrando descomponerlo y liberando oxígeno.



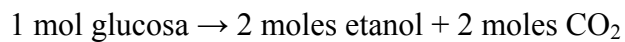
A él se le atribuye en general el haber sido el descubridor del oxígeno, el primero que lo obtuvo, aunque otros estudiosos dicen que en realidad el descubridor fue Scheele, pero como no lo publicó entonces Priestley se llevó los créditos.

Al tema de la respiración también aportó mucho Lavoisier, quien empezó estudiando leyes y sus primeros trabajos fueron en Literatura. Con respecto a la respiración, en el año 1778 establece la Teoría de la oxidación, tal cual a grandes rasgos hoy la conocemos. Previamente había una teoría llamada la Teoría del flogisto, que tenía una influencia vitalista muy fuerte. En el año 1780, Lavoisier dice: "La respiración es, por tanto, una combustión, lenta, es cierto, pero por lo demás perfectamente similar a la del carbón." Queda establecido que la respiración es una combustión, que - lo dice con toda claridad -

no es diferente a la del carbono. Lavoisier pensaba que la combustión de los alimentos ocurría en los pulmones; el químico Liebig (1803-1873) demuestra que ocurre en la sangre y Pfluger en el año 1872 muestra que hay respiración en todos los tejidos animales. Hasta el año 1900, en cuanto al tema de la respiración, no hubo grandes avances más allá de su asociación con la combustión y su ubicación espacial dentro del organismo.

El proceso de la fermentación.

La fermentación alcohólica es un proceso químico y el primero en caracterizarlo de esta forma fue Lavoisier. En el año 1810 se hizo el primer estudio cuantitativo de la fermentación: Gay-Lussac, un químico que se dedicó muy especialmente a los aspectos cuantitativos de la Química, obtiene la ecuación estequiométrica de la fermentación. Determina que la fermentación de 1 mol de glucosa, por la levadura, se transforma en 2 moles de alcohol y 2 moles de dióxido de carbono.



A partir de los trabajos de Lavoisier y Gay-Lussac el proceso de fermentación queda cuantitativamente determinado, pero ninguno de los dos se preguntó que era lo que provocaba que la glucosa fermentara y se transformara en dióxido de carbono, qué eran esas levaduras que generaban el proceso.

Recién en el año 1837, tres científicos (Cagniard-Latour, Kützing y Schwann) demuestran independientemente que la levadura está formada por células. Entonces surge toda una polémica sobre si la fermentación es un proceso que depende de la existencia de células intactas o podría ocurrir en ausencia de estas. En esta polémica opina Pasteur, investigador en Ciencias Físicas. Él es uno de los padres de la Microbiología, fue él quien hizo experimentos absolutamente rigurosos para demostrar que la generación espontánea no existía, o por lo menos que no era necesario recurrir a la generación espontánea para explicar muchos fenómenos que en ese momento se explicaban por ella. Además de hacer hallazgos impactantes, Pasteur también cometió errores que de alguna manera retrasaron un poco la evolución de las ideas. Adhirió a la idea de que la fermentación no podía ocurrir en ausencia de células. En el año 1860 afirmó: “El acto químico de la fermentación es, esencialmente, un fenómeno correlativo con el acto vital, comenzando y cesando con el mismo. Creo que la fermentación alcohólica no ocurre nunca sin la simultánea organización, desarrollo y multiplicación de células, o la continuación de la vida de las células ya formadas... Si se me pregunta en que consiste el acto químico de la descomposición del azúcar y cual es su causa real, debo admitir que lo ignoro totalmente.”. Como vemos su posición con respecto a este tema era un acto de fe. Algo que podemos extraer de estas líneas es que Pasteur era un individuo extremadamente lúcido, y cuando decía algo que él creía, lo hacía con toda claridad y, como en este caso, admitiendo además que era una corazonada. Obviamente con su enorme influencia, mucha gente pensó que, si él lo decía, debía ser cierto.

La filosofía de Pasteur era la de definir dos tipos de fermentos. Por un lado los fermentos “desorganizados” que incluían a la invertasa, la diastasa y la pepsina. Estas son enzimas que estaban aisladas, o más o menos aisladas, y se veía que eran fermentos que funcionaban en ausencia de células. Por otro lado, de acuerdo a lo que él planteaba, había fermentos “organizados”, como era el caso de la levadura, que dependían de la integridad del organismo viviente.

En el año 1878, el fisiólogo Külne introduce la palabra enzima. Su idea era llamar enzima a los fermentos desorganizados, o sea a las proteínas aisladas (invertasa, diastasa y pepsina), para

distinguirlos de los fermentos vivos o de la levadura. La palabra enzima viene del griego, “en zyme” que significa “en la levadura”.

El gran hallazgo sobre la fermentación lo hizo Buchner en el año 1897. Al igual que la síntesis de urea por Wöhler, esto ocurrió en forma fortuita. En realidad Buchner y su hermano estaban haciendo unas preparaciones de levadura con fines terapéuticos y, como querían venderla, necesitaban que fuera estable, por lo que tenían que agregarle un conservador. En aquel momento se usaba con estos fines un azúcar, la sacarosa. En general los conservadores se utilizan en concentraciones relativamente altas. Entonces los Buchner prepararon el extracto de levadura exento de células, le colocaron la sacarosa, y pensaron que se iba a mantener estable. Pero en realidad la preparación comenzó a fermentar, obteniendo dióxido de carbono y alcohol. Entonces ellos se dieron cuenta que había un proceso de fermentación, pero sabían que estaban haciendo un extracto de levadura que no contenía células. Esto llevó a que uno de los dos hermanos se dedicara a profundizar el trabajo y finalmente publicara un artículo en el año 1897, donde se concluía lo siguiente: “...se establece que un aparato tan complicado como la célula de levadura no es requerido para que el proceso de fermentación ocurra. Más bien, el portador de la actividad fermentativa del jugo de prensa debe ser visto como una sustancia disuelta, indudablemente una proteína. Esta será llamada ZIMASA... la descomposición del azúcar en alcohol y dióxido de carbono permanece como una de las reacciones más complicadas. En este proceso las uniones entre carbonos son escindidas con una completitud que no ha sido, hasta ahora, lograda por otros medios.”. Buchner no disimula su sorpresa, acerca de la complejidad de las transformaciones que realiza la acción de esta “enzima” que él denomina “zimasa”. Ahora sabemos, que el proceso de fermentación no es catalizado por una sola enzima sino por un sistema multienzimático formado por una multitud de componentes.

Hacia 1900, resumen del panorama

Así llegamos al año 1900. ¿Cuáles eran en este punto los conocimientos en cuanto a la Química orgánica y a la Cinética enzimática? En esta época había una Química orgánica moderna, tal cual hoy se la conoce, y bien desarrollada. Había toda una metodología que permitía abordar problemas de Química orgánica de una relativa complejidad. La Cinética enzimática estaba bien encaminada, y se termina de consolidar con Michaelis y Menten en 1913. El proceso de la respiración era poco conocido y el de la fermentación ya estaba funcionando *in vitro*. El descubrimiento de Buchner sobre la fermentación resulta esencial. Abre la puerta a una manipulación de los microorganismos donde se rompe la estructura y se analizan sus componentes, tratando de reproducir algunas reacciones de sus procesos aisladamente.

De alguna manera se consolidó la idea de que el método reduccionista podía llevar a dar importante información sobre los procesos que ocurren en la célula y que no era necesario conservar la célula intacta para mantener funcionales y poder obtener información sobre estos procesos. Podríamos decir que, Buchner abrió la puerta para el abordaje “*in vitro*” de los procesos químicos que ocurren en los seres vivos usando una metodología reduccionista.

II -Después de 1900.

Catálisis.

Al trabajo de Henri sobre la catálisis le faltaba considerar dos cosas, el efecto del pH y el de la mutarrotación. En el año 1909, el bioquímico Sorensen define el pH y demuestra su influencia sobre la acción enzimática. Además, en el año 1913, Michaelis y Menten tienen en cuenta el efecto del pH en la reacción de la invertasa, y la mutarrotación de los productos de reacción. Proponen para la descripción cuantitativa del fenómeno la hoy denominada ecuación de Michaelis-Menten, que es formalmente igual a la de Henri, aunque ligeramente distinta en cuanto a sus argumentos teóricos. A partir de este momento la Cinética enzimática termina de consolidarse.

Luego vienen algunos avances teóricos. En el año 1925, Briggs y Haldane demuestran que no es necesario recurrir a hipótesis de equilibrio rápido para deducir la ecuación de Michaelis-Menten. Plantean la hipótesis de estado estacionario del complejo, o sea que el complejo de reacción enzima-sustrato, en la escala de tiempo donde ocurre la reacción, se encuentra en concentración aproximadamente constante. Aquí se plantea una hipótesis teórica muy importante, que requería de una constatación empírica. El primer apoyo experimental directo a la hipótesis del estado estacionario proviene de un trabajo muy elegante, que hace Chance en 1943 con su tesis de doctorado. En ella no innova en los métodos experimentales, que adapta de otros trabajos conocidos; sigue reacciones rápidas con métodos espectrofotométricos. Hace un modelo teórico con ecuaciones diferenciales no lineales, y simula este modelo con un computador analógico (todavía no existían las computadoras digitales). La elegancia de su trabajo consiste en que hace confluír en su contribución científica: un trabajo experimental muy bien hecho, un modelo bien desarrollado, la simulación de las ecuaciones por computador y la comparación entre experimentos y teoría, logrando determinar valores experimentales de las constantes cinéticas. Chance muestra que, en ciertas condiciones, la gráfica complejo enzima-sustrato en función del tiempo tiene un intervalo donde la concentración es aproximadamente constante, obteniendo las condiciones de validez de la hipótesis de estado estacionario planteada por Briggs y Haldane.

En el año 1956, en trabajos independientes de Umbarger por un lado y de Yates y Pardee por otro, se descubren dos casos en que el producto final de una secuencia de reacciones enzimáticas (vía metabólica) inhibe a la enzima de la primera reacción. Este descubrimiento desencadenó una cantidad de trabajos sobre un fenómeno de la cinética enzimática que se denominó alosterismo. La velocidad de las reacciones enzimáticas, además de ser afectada por factores específicos como la concentración de sustrato y de producto e inespecíficos como el pH y la fuerza iónica, pueden ser afectada en forma específica por la presencia de otras moléculas, cuya estructura no guarda ninguna relación estructural con la de los sustratos o los productos. Estos experimentos son el paso inicial al desarrollo de la teoría alostérica que se produce principalmente en la década siguiente.

Para terminar con la catálisis, un punto que revolucionó la concepción de catálisis biológica es el descubrimiento de las “ribozimas”, o sea ácidos nucleicos (ARN) que pueden tener actividad catalítica. Esta es otra área que a partir de principios de la década de los años 1980 se ha desarrollado. Es un fenómeno que, a pesar de su relativa juventud, parece estar bien establecido. Las ribozimas han cambiado la concepción de que la catálisis biológica está exclusivamente asociada a las proteínas, si bien en este ámbito sigue siendo abrumadora la ventaja de las proteínas sobre los ácidos nucleicos.

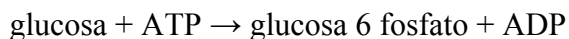
Fermentación y respiración.

Pasamos ahora a ver como, a partir del año 1900, se sucedieron algunos avances en cuanto al conocimiento de la composición y estequiometría de los sistemas multienzimáticos, en particular, los responsables de los procesos de fermentación y respiración.

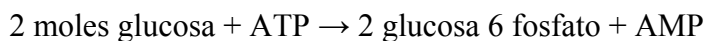
Como vimos más arriba, los trabajos de Buchner de fin del siglo XIX concluían que existe una gran enzima que realiza el complicado conjunto de procesos químicos asociados a la fermentación y cuyas propiedades se pueden estudiar *in vitro*. En el año 1905, Harden y Young publican su primer trabajo sobre estudios en extracto de levadura de la fermentación de glucosa a etanol. Ellos ven que este proceso ocurre a una gran velocidad y se apaga rápidamente, pero que si se agregan fosfatos se vuelve a prender. Lo que corroboran es que el fosfato añadido desaparece, como fosfato inorgánico, y aparece incorporado como fosfato orgánico (fosfato ligado a moléculas orgánicas). En este primer experimento, Harden y Young aislaron el originalmente llamado éster de Harden y Young, que corresponde al compuesto fructosa 1,6 difosfato. Luego se descubrieron otros ésteres, el llamado éster de Robinson que es la glucosa 6 fosfato y el éster de Neuberg que es la fructosa 6 fosfato.

En otro experimento fundamental, Harden y Young dializaron extracto de levadura. Este procedimiento, esquemáticamente, consiste en poner una bolsa semi-permeable que contiene una solución dentro de un recipiente con agua (o una solución amortiguadora adecuada). La bolsa es semipermeable en el sentido que posee poros por los que las moléculas grandes no pueden salir, mientras que las moléculas chicas si pueden difundir. Como resultado de la diálisis obtienen dos fracciones. La fracción que dializa, que es la que sale de la bolsa, era termoestable, o sea que no se destruye por tratamiento con temperatura y le llamaron la cozimasa; hoy se sabe que son los compuestos NAD, ATP, Mg y otros cofactores que se precisan para el proceso de degradación. Mientras que la fracción que no dializa, y queda dentro de la bolsa, era termolábil, o sea que es afectada por la temperatura al igual que las proteínas, y es donde se encuentran las enzimas que habían sido denominadas zimasa.

Meyerhof en el año 1927, descubre otra reacción, en la que a partir de glucosa más ATP se obtiene glucosa 6 fosfato más ADP, mediante la enzima hexoquinasa.



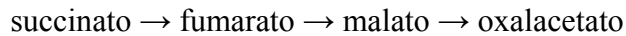
Esta historia también es interesante en el sentido que ésta es la reacción tal cual la conocemos hoy, pero al principio no se postuló esta reacción sino que se había postulado que 2 moles de glucosa más 1 mol de ATP daban lugar a 2 moles de glucosa 6 fosfato más 1 mol de AMP.



Esto se debe a que los extractos no purificados usados contenían otra enzima, la adenilatoquinasa. Esta enzima es la que transforma al ATP en AMP. Los problemas que surgieron por el uso de extractos crudos, no purificados, debe haber sido en parte lo que motivó que la purificación de las enzimas se transformara en una obsesión de los bioquímicos. De alguna manera, el hecho de que luego de la purificación llegara el éxito debe haber sido uno de los mensajes importantes que fomentaron llevar el reduccionismo a su mayor grado de pureza.

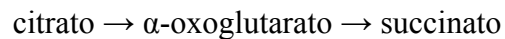
Con el devenir de los años se determinaron las etapas de la vía glicolítica tal cual se conoce actualmente (Figura 1). Desde la glucosa hasta el etanol más anhídrido carbónico, esa zimasa postulada por Buchner, era nada menos que una cantidad de reacciones catalizadas por muchas enzimas diferentes. Realmente su apreciación de que estaba en presencia de una enzima que hacía una tarea increíblemente complicada era muy buena, porque en realidad no se trataba de una enzima sino de un batallón de estas.

Más adelante se producen dos hallazgos que llevaron a Krebs a postular el ciclo que lleva su nombre. El primero fue un trabajo de Szent-Györgyi en el año 1935, en el que propone una secuencia para la oxidación del succinato. Propone que el succinato se oxida a oxalacetato pasando por fumarato y malato:



Hace además una observación que cree interesante, pero en ese momento no ve la trascendencia que tiene, y es que si agrega oxalacetato o malato al medio de reacción, se produce mucho más anhídrido carbónico que el que produciría la transformación completa de esa molécula de succinato a anhídrido carbónico. Concluyó que al agregar una de esas moléculas (oxalacetato o malato) se desencadena la oxidación de algún compuesto endógeno y que una sola molécula puede promover la oxidación de muchas moléculas de sustrato endógeno. Es como si el oxalacetato y el malato “catalizaran” la formación de anhídrido carbónico. Este fue un hallazgo notable pero, en su momento, difícil de interpretar.

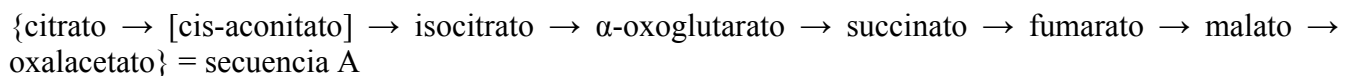
Martius y Knoop, en el año 1937, descubren la secuencia que va desde citrato hasta succinato, pasando por α -oxoglutarato:



Así se completa la secuencia que va desde citrato hasta oxalacetato y este trabajo preparatorio le da a Krebs la posibilidad de, con algún trabajo adicional y mucho ingenio, postular el ciclo del ácido cítrico, también llamado ciclo de Krebs o ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

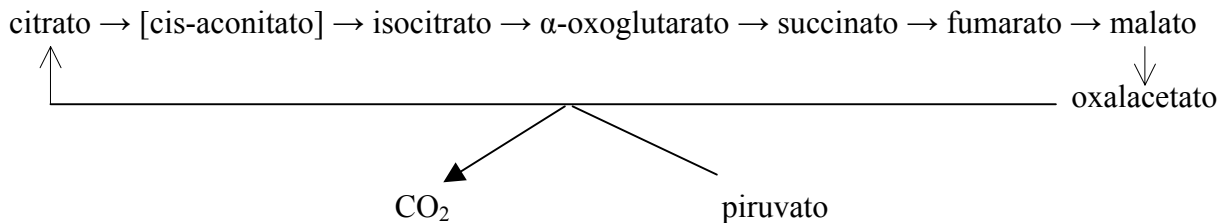
Para esto Krebs, en el año 1937, trabaja con un sistema de suspensión de papilla de músculo pectoral de paloma, muy crudo y heterogéneo. Él se da cuenta que tiene las dos secuencias que ya habían sido descubiertas previamente y su razonamiento lo lleva a postular que estas se cierran en un ciclo, y el cierre de este ciclo produce la transformación de piruvato en anhídrido carbónico.

Hay toda una secuencia de compuestos que va desde el citrato al oxalacetato y que llamaremos A.



Las observaciones que condujeron a postular el ciclo son las siguientes: 1) Krebs comprueba que cuando agrega alguno de los ácidos dicarboxílicos o tricarboxílicos de la secuencia A, estos se oxidan a velocidad elevada, pero cuando agrega otros ácidos dicarboxílicos o tricarboxílicos, prácticamente no cambian o lo hacen a una velocidad mucho menor. Lo que quiere decir que los ácidos integrantes de la secuencia A son los relevantes para el proceso. 2) Al agregar piruvato y luego agregar los ácidos de la secuencia A, se estimula el consumo del mismo. 3) Agregado de malonato inhibe el pasaje de succinato a fumarato, porque es un inhibidor competitivo de la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa

(la succinato deshidrogenasa cataliza la conversión de succinato en fumarato). Si agrega malonato el estímulo que los integrantes de la secuencia A producían en el consumo de piruvato, es inhibido. 4) Estos resultados son compatibles con el hecho que si pone piruvato y oxalacetato en condiciones anaeróbicas, se forma citrato. Logra detectar el aumento de citrato, al agregar piruvato y oxalacetato, y postula que se trata de un ciclo, y que esta es la reacción que lo cierra. Luego hace otros experimentos que conducen a apoyar esta hipótesis. 5) Agrega cualquier intermediario de la secuencia A y se acumula succinato. 6) Puede revertir el bloqueo de la oxidación con malonato (ver 3), por agregado de piruvato. En esta situación, por cada molécula de piruvato consumido desaparece una de oxalacetato. Como el oxalacetato no puede regenerarse, no existe una estimulación como ocurre en ausencia del bloqueo, porque el ciclo no puede cerrarse. La capacidad de ciclar es la causa del estímulo que vio Szent-Györgyi. Estos y otros argumentos son los que llevan a Krebs a proponer y luego corroborar el ciclo que lleva su nombre:



La descripción de cómo fue descubierto este ciclo sirve de ejemplo para mostrar la gran cantidad de experimentos y de razonamientos que llevó develar la estructura de las vías metabólicas. Recién once años después, en 1948, Kennedy y Lehninger demuestran que el Ciclo de Krebs ocurre en las mitocondrias. Poco tiempo después se demuestra que el transporte de electrones en la cadena respiratoria, mediado por una cantidad de proteínas, es la fuente de energía para la síntesis del ATP. En el año 1961 se propone un mecanismo, hoy bastante aceptado, acerca de como ese transporte electrónico se utiliza para generar la síntesis de ATP. La propuesta, denominada teoría quimiosmótica, es hecha por Mitchell y consiste en la existencia como intermediario de un gradiente de protones a través de la membrana mitocondrial interna.

La secuencia de hallazgos fue avanzando muy rápido en el transcurso del siglo XX, lo cual no quiere decir que el itinerario no haya sido muy trabajoso, requiriendo un gran esfuerzo experimental y de razonamiento.

Parece interesante destacar una anécdota de Mitchell. El trabajo fundamental, que lo llevó a obtener el Premio Nobel en el año 1978, fue uno de los que publicó en el año 1961. Él llegó en 1955 a la Universidad de Edimburgo, y trabajó en el departamento de Zoología. Su tema de trabajo fundamental fue la Teoría quimiosmótica. Cuando propuso a principios de la década de los años 1960 estos trabajos, no tuvo aceptación; la comunidad científica fue bastante escéptica y en algunos casos casi llegó a ridiculizarlo. Se dice que Mitchell sintió una enorme presión por parte de la Universidad, por el hecho de que sus teorías estaban siendo muy notorias, no tanto por lo buenas que eran sino por el escepticismo de la gente con respecto a ellas. En el año 1963, Mitchell deja la Universidad de Edimburgo.

El descubrimiento de nuevos tipos de interacciones.

Pasamos del descubrimiento de los mapas metabólicos al de nuevas interacciones. Como ya mencionamos, en el año 1956 Umbarger descubre que la isoleucina inhibe a la enzima treonina deshidratasa, y en el mismo año Yates y Pardee llegan a comprobar que el CTP inhibe a la enzima aspartato transcarbamilasa. Entonces, no solamente se tiene un mapa de transformaciones químicas donde los sustratos se combinan para dar productos, sino que por encima existe un mapa de interacciones, con una red causal muy diferente a la de las transformaciones químicas que participa en la regulación de los procesos.

Un evento interesante es que Hers y Van Schaftingen, en el año 1980, cuando ya se creía que la vía glicolítica se conocía en su totalidad y que no había más intermediarios o moduladores por describir en esta vía, descubren la fructosa 2,6 difosfato, que es un activador de la glucólisis e inhibidor de la gluconeogénesis. Como vemos, hasta los fenómenos más estudiados y considerados como mejor comprendidos a veces pueden deparar sorpresas.

Por un problema de actualidad hay que mencionar a Blobel, que a principios de los años 1970 estudia las proteínas y ve que hay una porción de la secuencia de estas que es la que define su destino y su dinámica en cuanto a su distribución espacial dentro de la célula. Esto le vale el Premio Nobel de 1999.

Funcionamiento metabólico.

Con respecto al funcionamiento metabólico, el siglo XX comienza relativamente mal, porque comienza con el principio de la reacción maestra, o de la etapa limitante o también llamada cuello de botella, que dice que en una cadena de reacciones, la reacción más lenta determina la velocidad del sistema. Esto, Blackman lo postula en el año 1905 como un axioma. No entraré en detalles de la primera mitad del siglo donde este tema transcurrió con varias idas y venidas. El tema se empezó a resolver gracias a la aparición de las computadoras digitales, que comienzan a aparecer en los laboratorios de investigación por el año 1960.

En el año 1965 Higgins, que era discípulo de Chance, tiene una computadora en su laboratorio muy buena para su época, con la que realiza una cantidad de simulaciones que lo orientan para hacer estudios teóricos. Llega a la conclusión, entre otras, que en una secuencia de reacciones todas las enzimas pueden tener el mismo control sobre la velocidad. O sea que no necesariamente tiene que haber una enzima limitante, y el axioma de Blackman de 1905 se desmorona. Este tipo de temas recién empieza a estudiarse bien cuando aparecen las computadoras digitales, porque se llega a un nivel de modelos donde las simulaciones se hacen imprescindibles.

Otro paso adelante en cuanto a los formalismos para estudiar el control de los sistemas metabólicos y, en particular, las condiciones en las cuales hay o no una enzima limitante, tiene lugar en los años 1973 y 1974. Kacser y Burns, y Heinrich y Rapoport, respectivamente en esos años, en forma independiente, proponen una teoría de sensibilidad para los sistemas metabólicos. Este tipo de aproximación permite explicar una cantidad de fenómenos experimentales, que no lo eran hasta ese entonces. Por ejemplo, en general, cuando con fines biotecnológicos se trata de aumentar un flujo metabólico aumentando la concentración de una enzima, lo que se ve en la amplia mayoría de los casos es que el efecto sobre el flujo es casi nulo, prácticamente despreciable; todo ocurre como si no existiera

una enzima limitante. Además el efecto del aumento de la concentración de una enzima es en proporción menor cuanto mayor es la cantidad de enzima agregada.

Otro hecho para el que esta teoría de sensibilidad de los sistemas metabólicos dio una explicación está relacionado con las características de las enfermedades hereditarias asociadas a deficiencias enzimáticas. Los organismos diploides, como los seres humanos, tienen dos copias de un mismo gen. En algunos individuos, denominados heterocigotos, una de las copias es buena y la otra defectuosa. Si dicho gen codifica una enzima, en general el organismo heterocigoto se ve como si las dos copias del gen fueran normales. Este tipo de alteraciones se dice que es recesiva, el organismo con una copia defectuosa del gen posee un funcionamiento normal. En la amplia mayoría de los casos estudiados las alteraciones son recesivas, siendo esta propiedad explicable con la teoría de sensibilidad mencionada.

A partir de la utilización de las computadoras surgió una aproximación teórica alternativa de los sistemas metabólicos, iniciada por otro alumno de Chance (como Higgins) llamado Garfinkel. Chance no sólo hizo aportes importantes a la ciencia, sino que además formó discípulos que hicieron aportes importantes y en este sentido tuvo un gran efecto multiplicador. En el año 1961, en los albores del uso de computadoras en el ámbito académico, por primera vez se estudió un modelo de 22 reacciones metabólicas que incluían a la glicólisis y la fosforilación oxidativa. Garfinkel hace simulaciones en computadora del modelo y empieza a estudiar como funcionan dinámicamente los sistemas metabólicos. Esto abrió toda una línea de trabajo un poco distinta de la que comienza con Higgins. Mientras que las teorías de sensibilidad intentan obtener leyes generales que sean válidas más allá de los detalles del sistema metabólico, esta línea alternativa intenta describir los sistemas usando todo el conocimiento existente sobre ellos. Empezó con 22 reacciones, pero luego se llegó hasta modelos con más de 200 ecuaciones diferenciales e, incluso, algunos donde se intenta describir el comportamiento de una célula entera, como es el eritrocito. Esta filosofía de aproximación a los problemas metabólicos requiere de la existencia de computadoras poderosas.

No intentaré medir el impacto que cada una de estas teorías, surgidas hace 3 o 4 décadas, ha tenido sobre nuestra visión del tema, porque ambas tienen fervientes adherentes y estamos aún muy cerca todavía de su surgimiento, si bien tengo mis propios prejuicios como todo científico sobre hacia qué lado debería dirigirse fundamentalmente el camino de investigación en estos temas. En resumen, los dos tipos de marcos teóricos alternativos son muy diferentes. Uno, como la teoría de sensibilidad de sistemas metabólicos estudia las propiedades que subsisten más allá de cuales sean los detalles estructurales y cinéticos del sistema. El otro tipo de teoría, que se basa en la simulación numérica del sistema, intenta incorporar todos los detalles conocidos de la realidad de forma de reproducirla *in silico*. Una trata de comprender el sistema con la menor cantidad de información posible, la otra trata de incorporar toda la información disponible para comprender el sistema. Son dos filosofías muy distintas y ambas están avanzando por sus respectivos caminos.

Pasando a aspectos más dinámicos del metabolismo, el inicio de las oscilaciones metabólicas como área de investigación se lo puede datar a comienzos del año 1955, cuando Wilson y Calvin observaron que la fotosíntesis es un proceso que produce oscilaciones amortiguadas. En el año 1964, Chance, Ghosh, Hess y una gran cantidad de autores más, trabajaron con extracto de levadura y con levadura intacta, llegando a la conclusión de que los intermediarios de la Vía glicolítica presentan oscilaciones sostenidas. En este caso no se trata de oscilaciones amortiguadas, sino que la amplitud de oscilación en las concentraciones permanece constante a lo largo del tiempo. Este fenómeno no solo se obtiene en extracto sino también en células intactas. Finalmente, en el año 1984, el grupo de Hess, Markus y Kuschmitz usa un extracto libre de células, al cual alimentan con un suministro de glucosa periódico y ven que los intermediarios presentan un comportamiento caótico.

El futuro (una meta).

Para terminar hablemos del futuro. De alguna manera la Historia debería servir para proyectar nuestro futuro. Una meta posible en el futuro de la Bioquímica sería la siguiente.

El siglo XX termina con la estructura del metabolismo relativamente bien determinada, por lo menos en algunos organismos. Se conoce el mapa metabólico en forma bastante exhaustiva. Por otro lado se ha desarrollado la Biología molecular que es una herramienta extremadamente poderosa. Permite, entre otras acciones, insertar copias de genes en un organismo y cambiar las propiedades de las proteínas mutando genes en una forma dirigida (no al azar). Entonces se tiene la estructura metabólica, se sabe que gen corresponde a determinada enzima y estos pueden modificarse. Hay modelos de funcionamiento metabólico y teorías compatibles con la información experimental disponible. Están pues dadas las condiciones para aplicar estas teorías a los sistemas de estructura conocida con el fin de modificarlos, usando las herramientas de la Biología molecular, en alguna forma preestablecida. Esto, en realidad, constituye por ahora una aspiración, es un tema en el que se está trabajando y que todavía no está completamente resuelto.

Luego de una exposición minuciosa del antes y el después de 1900, imaginemos a un maestro de fines del siglo XIX o comienzos del siglo XX, que mirara hacia los últimos descubrimientos aquí relatados: ¿qué le llamaría más la atención?, ¿cuáles son los grandes cambios que le sorprenderían? Pienso que si Buchner, por ejemplo, viera lo que hoy está pasando, diría: “Yo sospeché que las cosas podían ser más complicadas, que la zimasa era algo más que una enzima, pero nunca pensé que tanto más complicadas”. El descubrimiento de la complejidad es algo que ha impactado a este siglo y que a su vez constituye uno de los grandes desafíos. Desde el punto de vista de la Cinética enzimática, ya con Henri las bases de la disciplina estaban bastante delineadas, claro que el advenimiento de la Teoría alostérica resultó una sorpresa. El encontrar las estrategias del ingeniero implementadas en los sistemas biológicos a través de la evolución, esto quizás hubiera impactado un poco a los enzimólogos de finales del siglo XIX. En cuanto a la función de los sistemas multienzimáticos, si Blackman presenciara el final del siglo XX quizás se sentiría también abrumado por la necesidad de teorías bastante más sofisticadas que su esquemático concepto de etapa limitante.

26 de octubre de 1999.
Primera corrección febrero 2002.