

Sesión científica del día 29 de octubre de 1930.

PRESIDENCIA DR. PI SUÑER

Sobre algunos compuestos de ácido fosfórico recientemente descubiertos en el músculo.

POR EL PROF. OTTO MEYERHOF

Es esta conferencia me ocuparé del estudio, desde un punto de vista bioquímico, de algunos compuestos de ácido fosfórico existentes en el músculo, de los que algunos probablemente juegan un papel esencial en los cambios químicos que tienen lugar durante la actividad muscular. De un modo principal me ocuparé del ácido pirofosfórico en combinación orgánica, compuesto cuya presencia en el muslo se ignoraba hasta hace poco y cuyo descubrimiento se debe a los trabajos realizados por el Dr. Lohmann en mi laboratorio. Como quiera que estos compuestos orgánicos del ácido fosfórico con sustancias químicamente muy diversas, y como el papel que desempeñan en el metabolismo del músculo es también muy diferente, esta conferencia ha de quedar necesariamente subdividida en varias secciones. El hecho de estudiarlos juntos en una sola conferencia se justifica sin embargo por varias razones.

En primer lugar, no sólo contienen todos estos compuestos ácidos fosfóricos en su molécula, sino que, además, todos poseen la propiedad, en el curso del recambio muscular, de liberar dicho ácido fosfórico en forma de ortofosfato (desde luego con mayor o menor facilidad según el compuesto de que se trate) por la acción de fermentos hidrolíticos o fosfatasa.

En segundo lugar, el método por el que se descubrieron todos estos compuestos fosfóricos, se basaba en idéntico principio, a saber, en la liberación de fosfato por la acción de agentes químicos y de fermentos musculares.

En tercer lugar y de un modo principal, el estudio en conjunto de estos compuestos está justificado por razones históricas, pues el concepto que hace algunos años se tenía sobre el papel del ácido fosfórico, era en cierto modo demasiado sencillo. El fisiólogo de Francfort, Embden, creía que del fosfato ácido soluble del músculo, sólo un compuesto tomaba parte en los cambios químicos de la actividad muscular, especialmente en la formación de ácido láctico. A este compuesto, al que consideraba como la sustancia madre del ácido láctico, dió Embden el nombre de "lactacidógeno". Este compuesto sería muy análogo o idéntico al éster hexosodifosfórico de Harden-Young y en el músculo se desdoblaría con liberación de cantidades equimoleculares de ácido láctico y ácido fosfórico. En vez de este único compuesto orgánico de ácido fosfórico, se conoce ahora la existencia de tres grupos diferentes de compuesto que participan en diversas partes del metabolismo muscular y cuya única analogía estriba en que todos ellos liberan ácido fosfórico por la acción de determinados fermentos. La idea de Embden que acabamos de exponer puede actualmente mantenerse en un sólo punto, a saber, que el ácido hexosofosfórico, en analogía con los procesos de la fermentación alcohólica, constituye en el músculo un producto intermediario del catabolismo de los hidratos de carbono. Es conveniente, por tanto, que me ocupe en primer lugar de este grupo de ácidos hexosofosfóricos.

Como ya he mencionado, nos encontramos aquí, no ante un único compuesto, sino ante una serie de ésteres de propiedades químicas y biológicas diferentes. Todos estos compuestos se originan en virtud de procesos fermentativos y de modo análogo se descomponen. Por la acción de la levadura se desdoblan en H_3PO_4 (ácido fosfórico), alcohol y CO_2 (anhídrido carbónico); en los extractos musculares, en H_3PC_4 y ácido láctico. Existe un método muy sencillo para la distinción de los tipos ya conocidos de ácidos hexosofosfóricos y aun para el descubrimiento de tipos nue-

vos. En este método, desarrollado por Lohmann en mi laboratorio, se estima la velocidad de la liberación hidrolítica de fosfato inorgánico en una solución libre de proteínas, a 100 grados, por la acción de HCl n (ácido clorhídrico normal). Para ello se utilizan soluciones de los compuestos aislados o mezclas de los ésteres existentes en un extracto muscular. En pocas palabras, el método consiste en determinar la velocidad de hidrólisis ácida de dichos ésteres. Durante todo el curso de la liberación de ortofosfato, esta velocidad de hidrólisis es característica para cada ácido hexosofosfórico. El curso de una hidrólisis ácida de este tipo para los ácidos hexosomonofosfóricos ya conocidos, muestra la hidrólisis del llamado éster de Neuberg, que se obtiene por la separación química de una molécula de ácido fosfórico del éster hexosodifosfórico de Harden-Young. En este caso la velocidad de hidrólisis es al principio muy rápida hasta que se ha liberado un 80 por 100 del fosfato total presente; después se hace repentinamente más lenta. Cuando se calculan las constantes de velocidad de esta hidrólisis, según la fórmula de las reacciones monomoleculares, no obtenemos un valor constante, como sucedería con un éster simple, sino dos valores diferentes. Una constante es válida para el primer 75 por 100 de descomposición. Esto corresponde a una reacción monomolecular que coincide con la curva del éster de Neuberg hasta que se ha desdoblado un 75 por 100. Si se aplica al mismo método para el éster de Robison del extracto de levadura o para el éster de Embden, que dicho autor aisló del músculo fresco, el resultado es enteramente distinto. Para el primer 10 por 100 de hidrólisis, obtenemos la misma constante que para el éster de Neuberg, pero entonces la velocidad disminuye y alcanza un valor constante cuando se ha desdoblado un 25 por 100 aproximadamente del éster. La magnitud de esta segunda constante es aproximadamente una décima de la obtenida para la parte inicial.

Puede demostrarse de múltiples maneras que, en lo referente a estos ésteres, nos encontramos ante mezclas constituidas principalmente por dos componentes. Uno de éstos es difícil de hidrolizar y el residuo de azúcar existente en su molécula es una aldosa, mientras que el otro se desdobra con mucha mayor facilidad y contiene un residuo de cetosa. Los dos componentes pueden separarse en gran extensión. Por ejemplo, el fácilmente desdoblable, puede separarse primero por hidrólisis y el éster restante se separa ulteriormente. Este éster residual está casi exclusivamente constituido por ácido fosfórico y aldosa.

Otros métodos han conducido a los mismos resultados. El éster de Embden existente en el músculo vivo y análogamente el éster de Robinson de la levadura, están constituidos por cerca de un 80 por 100 de aldosa y un 20 por 100 de cetosa, mientras que, por el contrario, el éster de Harden-Young y el éster de Neuberg, obtenido el primero, contienen alrededor de un 80 por 100 de cetosa y un 20 por 100 de aldosa. Estos ésteres, cuya composición es casi siempre la misma, se originan durante la fermentación, tanto si se utiliza glucosa como si se emplea fructosa como sustancia inicial.

La hidrólisis de todos estos ésteres por el enzima formador de ácido láctico, es idéntica, hecho que indica una estrecha relación entre ellos, o la capacidad que cada uno de ellos tiene de ser convertido en uno de los otros.

El método hidrolítico no permite tan sólo una caracterización y distinción de los ésteres ya conocidos sin recurrir a métodos químicos de separación, sino que conduce también al descubrimiento de nuevos ésteres. Estos nuevos ésteres aparecen como productos intermediarios, no sólo en el recambio de los hidratos de carbono genuinos, sino también como productos de los ésteres ya mencionados. Si se inhibe la glucólisis de un modo especial, por ejemplo, por la acción del fluoruro, se observa una acumulación de estos ésteres. Embden fué el primero en reconocer que cuando se añade fluoruro a una papilla de músculo, tiene lugar una acumulación de éster, que él creyó sería ácido hexosodifosfórico, del tipo de Harden-Young. La formación de ácido láctico se inhibe en estas condiciones. Las investigaciones por el método de hidrólisis ya descrito, llevadas a cabo por Lohmann en nuestro Instituto, demuestran que si en presencia de fluoruro se forma en ciertas condiciones una cantidad sumamente pequeña de éster de Harden-Young, la mayor cantidad del éster formado es, sin embargo, un ácido hexosodifosfórico de características totalmente diferentes. Es mucho más difícil de hidrolizar que el éster de Harden-Young, siendo la constante de descomposición una vigésima parte aproximadamente de la de aquél. Las sales de bario y plomo son además mucho más solubles. Este "éster de Lohmann",

como puede llamarsele, no sólo se origina durante el recambio del ácido hexosofosfórico de Harden-Young, en presencia del fluoruro. Lohmann y Lipmann han podido obtener además un éster similar en circunstancias en que el sistema enzimico se había debilitado funcionalmente por dilución, interrumpiendo así la formación de ácido láctico.

En la célula viviente y, a lo que parece, en la levadura y en el músculo, sólo existe un éster, el de Embden-Robison. A consecuencia de la coordinación entre formación e hidrólisis, no se descubre en general una descomposición mensurable de este éster, ni aun en el caso de la contracción muscular, en que repentinamente se forma una cantidad grande de ácido láctico. Indudablemente el compuesto inestable intermediario es, por un lado, formado de nuevo tan rápidamente, como por otro lado se descompone. Todos estos compuestos, muy interesantes desde un punto de vista químico, son sin embargo, desde un punto de vista biológico, sólo de un interés secundario, porque aparecen en tanta variedad sólo en los extractos acuosos de células o tejidos y no en el músculo viviente mismo.

No sucede así, sin embargo, con el segundo compuesto o grupo de compuestos del que ahora paso a ocuparme, es decir, con el ácido pirofosfórico en combinación orgánica. Embden creía no solamente que el lactacidógeno sería el ácido hexosofosfórico, sino que había desarrollado un método para la valoración cuantitativa del mismo. La valoración se funda en el aumento de fosfato inorgánico en un extracto muscular después de varias horas de incubación del mismo con bicarbonato a 42 grados. Lohmann ha demostrado que la mayor parte del fosfato liberado en este período de autólisis, no procede en absoluto de un éster hexosofosfórico y no tiene nada que ver con la formación de ácido láctico, por lo menos de un modo directo, sino que se trata en este caso del desdoblamiento hidrolítico de pirofosfato en ortofosfato.



Si se hidroliza un extracto filtrado de músculo fresco en ácido tricloroacético, se obtiene una curva de hidrólisis en la que la mayor parte del fosfato aparece en forma de ortofosfato ya a los siete minutos de hidrólisis en HCl n (ácido clorhídrico normal) a 100 grados. Si se repite la hidrólisis ácida, pero con el filtrado obtenido de músculo previamente incubado en bicarbonato, se obtiene una curva en la que el compuesto fácilmente desdoblado ha desaparecido; en su lugar el fosfato directamente estimable ha aumentado. No hay ningún ácido hexosofosfórico que se hidrolice tan rápidamente en medio ácido; si sucede así, sin embargo, con el ácido pirofosfórico, al que ulteriormente se ha podido aislar de los tejidos en estado de pureza.

Al mismo tiempo se ha demostrado que todas las células contienen pirofosfato, pero que se le encuentra en la mayor proporción en el músculo y la levadura; hecho del que se ha sacado la conclusión que dicho ácido debe estar en cierto modo relacionado con el metabolismo de los hidratos de carbono. Este pirofosfato no se encuentra en el músculo en forma inorgánica, sino, como ulteriormente demostró Lohmann, se encuentra formando un compuesto muy lábil, con un derivado del ácido nucleico, el ácido adeninribosofosfórico o ácido adenílico. Este ácido, al que como constituyente del ácido nucleico se le conoce hace tiempo, fué hallado por Hoffmann en la sangre en estado libre, y ulteriormente Embden lo ha encontrado en el músculo. Este ácido es además, como Embden y Parnas han demostrado, la fuente del amoníaco que se libera durante la contracción. Es probable que el grupo de pirofosfato esté unido al ácido fosfórico del ácido adenílico.

Cuando este compuesto se desdobra, separándose el ácido pirofosfórico del ácido adenílico, quedan en libertad dos valencias ácidas, lo que habla en favor de la hipótesis de que el pirofosfato esté unido al ácido fosfórico de ácido adenílico.

El ácido adenilpirofosfórico, como denominamos a este compuesto, juega un papel especial en la formación de ácido láctico en el músculo. El músculo y las células de la levadura, contienen un cofermento idéntico, que de un modo análogo toma parte, tanto en la fermentación alcohólica como en la formación de ácido láctico. Así como puede hacerse que se verifique la fermentación añadiendo a un extracto dializado de levadura un extracto hervido de músculo, puede también hacerse que la formación de ácido láctico tenga lugar en un extracto muscular dializado por la

adición de un extracto hervido de levadura. Los ulteriores experimentos de purificación del fermento formador de ácido láctico en los extractos musculares, que han sido llevados a cabo en nuestro laboratorio por K. Meyer, permiten ahora separar aun más en sus componentes al sistema enzimico. Por medio del método de adsorción de Willstätter para la purificación de los fermentos, se puede separar 95 por 100 de las proteínas sin pérdida ninguna de actividad fermentativa. El fermento así purificado es capaz de formar ácido láctico a expensas de hidrato de carbono que se le añade, si se le añade también fosfato y un extracto muscular hervido. Si a este último extracto, antes de la ebullición, se le mantiene algún tiempo a 37 grados, se hace incapaz de activar la solución purificada del fermento, pero recobra de nuevo su actividad si se le añade una fracción determinada del precipitado bórico obtenido de los extractos musculares. Después del descubrimiento del ácido adenilpirofosfórico se ha puesto de manifiesto que la substancia activa en dicho precipitado bórico es precisamente aquel ácido. Durante la autólisis de un extracto muscular fresco, se descompone este compuesto separándose el grupo del ácido pirofosfórico, y con desprendimiento de amoníaco del ácido adenílico, que se transforma, en virtud de esto, en el llamado ácido inosínico. Una solución de cofermento autolizada recobra por tanto su actividad si se le añade ácido adenilpirofosfórico puro, obtenido de un extracto muscular fresco. Como Lohmann ha demostrado recientemente, el ácido adenilpirofosfórico puede también transformarse directamente en ácido inosinpirofosfórico. Por lo que queda dicho, no hay duda de que debemos considerar el ácido adenilpirofosfórico como un eslabón en la cadena de procesos que entran en juego en la formación del ácido láctico y en la fermentación alcohólica, pues con levadura seca bien lavada, puede repetirse estos experimentos con idéntico resultado. Este compuesto tiene acción activadora juntamente con un segundo constituyente del sistema coenzimico, por lo que podemos considerarlo como un complemento de la coenzima. Se ha observado, además, que no sólo el ácido adenilpirofosfórico, sino que también el ácido adenílico libre, posee esta acción de complemento. La explicación de este hecho es muy interesante. Lo que sucede es que los fermentos del extracto muscular sintetizan en presencia de fosfato y ácido adenílico, ácido adenilpirofosfórico. Esta notable síntesis se verifica con extraordinaria rapidez dentro de los primeros uno o dos minutos después de la adición de ácido adenílico. Así podemos comprender que el ácido adenílico actúe prácticamente del mismo modo que el adenilpirofosfórico, y además se esclarece el hecho observado por Euler, quien en los preparados más puros de cofermento había hallado siempre ácido adenílico, y que dichos preparados perdían su actividad si se destruía aquél.

Finalmente, paso a ocuparme del tercer grupo de compuestos de ácido fosfórico existentes en el músculo; me refiero al fosfágeno, o mejor dicho, a las substancias del grupo del fosfágeno, cuyo fosfato se consideraba hasta hace poco como inorgánico, por encontrarse en esta forma en los extractos ácidos de músculo. Eggleton ha hallado fosfágeno solamente en el músculo de los vertebrados y en realidad tan sólo en el músculo estriado; no lo encontró, sin embargo, en los músculos de los invertebrados, en los que la creatina falta casi por completo. Cuando la importancia del ácido creatinofosfórico se puso de relieve, hemos tratado de encontrar un sustituto del mismo en los músculos de los invertebrados que trabajan de modo análogo a los de los vertebrados. Le hemos hallado en forma de un compuesto de arginina y fosfato. La investigación química de ambos compuestos (del que se encuentra en el músculo de los vertebrados y del hallado en el músculo de los invertebrados), conduce a la conclusión de que ambos están contruidos de un modo idéntico. Que el grupo guanidínico está unido directamente al ácido fosfórico y, por lo tanto, que nos encontramos ante un ácido aminofosfórico, lo demuestra el hecho de que se comporten estos compuestos de modo análogo a como lo hace el ácido aminofosfórico inorgánico simple, frente a los agentes hidrolíticos y también, en el caso del compuesto de arginina, por el hecho de que el grupo amínico permanece libre en la molécula. A pesar de la gran semejanza existente entre ellos, se diferencian entre sí estos dos fosfágenos naturales desde un punto de vista químico. Para la determinación química de estos compuestos, es particularmente interesante el hecho de que el desdoblamiento, en medio ácido, sea en mucho acelerado en el caso del ácido creatinofosfórico por la presencia del molibdato, mientras que en el del ácido argininfosfórico el desdoblamiento es interesantemente inhibido de tal modo que este último compuesto se desdo-

bla, en estas condiciones, unas mil veces más lentamente que el primero. Por esta causa no lo encontraron los descubridores del fosfágeno de los vertebrados.

La distribución de los fosfágenos en el reino animal es de gran interés biológico. Todos los vertebrados, incluso el *amphioxus*, contienen ácido creatinfosfórico en los músculos estriados; todos los invertebrados contienen, por el contrario, ácido argininfosfórico. Se observa aquí, por tanto, una verdadera mutación química que conduce de la arginina (un compuesto que como componentes de las proteínas se halla ampliamente difundido) a la creatina, un compuesto especial que de un modo principal y casi exclusivo existe en el músculo. Funcionalmente desempeñan ambos fosfágenos un papel análogo. El ácido argininfosfórico se encuentra, además en determinados músculos lisos, pero desde luego, tan sólo en aquellos que tienen analogía con los músculos estriados de los vertebrados, como los músculos longitudinales de la *holoturia* y el retractor de la faringe del *sibunculus*; mientras que no se encuentra, por ejemplo, en los músculos de la manta del *octopus*. Análogamente se le encuentra también en la parte estriada de los músculos de la almeja, pero no en los músculos blancos, llamados músculos tónicos, de dicho animal. El ácido argininfosfórico se encuentra indudablemente aquí en relación con las funciones relativamente rápidas de los músculos y de hecho se desdobra con diferentes grados de facilidad, según la velocidad de la respuesta de los músculos respectivos. Por ejemplo, se descompone con gran rapidez en los rápidos músculos del *ecten*, pero sólo muy lentamente en los músculos de la *holoturia*. Este comportamiento se corresponde con el análogo del ácido creatinfosfórico en los vertebrados. Como el calor del desdoblamiento del ácido argininfosfórico es de magnitud aproximadamente idéntica al del ácido creatinfosfórico, podemos considerar que el primero desempeña en los cambios energéticos el mismo papel que el segundo, hecho del que ya nos hemos ocupado en la primera conferencia. De hecho me comunica el Dr. Lundsgaard que en experimentos que acaba de llevar a cabo en Plymouth ha podido demostrar que es posible intoxicar también los músculos estriados de crustáceos (*Maia squinado*) con ácido iodacético. La formación del ácido láctico es inhibida, mientras que el desdoblamiento del ácido argininfosfórico aumenta en grado análogo al del ácido creatinfosfórico en los músculos de los vertebrados.

Aunque aquí sólo hemos mencionado algunos de los fenómenos recientemente descubiertos, relacionados con los compuestos fosfóricos ácidosolubles del músculo, podrán ustedes darse cuenta de que estos hechos han conducido a una gran ampliación de nuestros conocimientos. Estos conocimientos no son, sin embargo, suficientes para reunir los hechos aislados que han ido poniéndose de manifiesto, y formar con ellos un cuadro comprensivo de los procesos químicos de la actividad muscular. Esta unificación debe ser el fruto de futuras investigaciones.
