

***Interpretación de la función enzimática de las proteínas
a partir de la teoría de unidades de nivel de integración***

CHOMIN CUNCHILLOS

Fundación para la Investigación sobre Biología Evolucionista
Madrid

RESUMEN

La Función enzimática realizada por las proteínas globulares que gobiernan las transformaciones metabólicas ha sido tradicionalmente interpretada como una catalisis molecular.

Esta interpretación presupone que el enzima acelera las transformaciones químicas en que interviene sin consumirse, ni material ni energéticamente, en ellas , más en concreto, sin alterar su punto de equilibrio. Sin embargo, los datos aportados por la bioquímica sobre los mecanismos íntimos de las transformaciones metabólicas, su dependencia de la temperatura, la vida media de los enzimas, etc.. parecen contradecir esta interpretación.

La interpretación que la Teoría de unidades de niveles de integración, desarrollada por F. Cordón, hace de las proteínas globulares, como unidades de un nivel de integración intermedio entre el molecular y el celular, permite enfocar el problema de la “catalisis enzimática” de un modo nuevo. Una primera consecuencia de este enfoque es que, frente a la diversidad de mecanismos enzimáticos descritos para las distintas transformaciones metabólicas, Cordón desarrolla un modelo general de transformación metabólica y, correspondientemente, otro de representación de la misma, válidos para todas ellas, lo que, entre otras consecuencias, hace posible el análisis comparado de las transformaciones metabólicas y, por lo tanto, la reconstrucción de su despliegue evolutivo.

Introducción

En el capítulo anterior, hemos indicado que, según esta teoría, la proteína constituye un nivel intermedio entre el molecular y el celular. El objetivo de este trabajo podría haberse centrado en la exposición de los argumentos que, en nuestra opinión, permiten defender esta hipótesis ¹. Sin embargo, somos conscientes de que la trascendencia de la misma sólo se puede percibir plenamente desde la propia Teoría de unidades de nivel (el hecho de que la proteína constituya o no un nivel de integración puede parecer carente de importancia si se considera desde una perspectiva teórica diferente), por esta razón hemos preferido centrar este trabajo en un objetivo que permitiese llamar la atención sobre alguna de las implicaciones teóricas de este supuesto. En este sentido, si consideramos, desde la perspectiva de la Teoría de unidades de nivel, que la proteína es una unidad de nivel supramolecular, necesariamente, debemos replantearnos todas aquellas explicaciones de la proteína fundamentadas en su supuesta naturaleza molecular. Ahora bien, aunque, en general, todas las explicaciones vigentes relativas a las funciones de las proteínas mencionan expresamente su carácter molecular, pocas de ellas recurren, explícitamente, a propiedades estrictamente moleculares para explicar las propiedades de las proteínas. La interpretación de la actividad enzimática como catálisis química es una notable excepción, a cuya consideración vamos a dedicar este trabajo.

Antes de comenzar, conviene dejar claro que con este trabajo nos proponemos :

- en primer lugar, exponer algunos hechos relevantes, relativos a la actividad enzimática, que encajan mal en la interpretación de los enzimas como catalizadores, en nuestra opinión, como consecuencia de que dicha interpretación, que viene impuesta por la consideración de la proteína como molécula, hace una interpretación forzada de estos datos; y,

- en segundo lugar, plantear una interpretación alternativa de la actividad enzimática, a partir de considerar que la proteína es una unidad de nivel supramolecular, así como algunas de sus consecuencias prácticas.

Con este doble objetivo ², a lo largo de este trabajo vamos a tratar de exponer :

- en primer lugar, las características esenciales que debe reunir un catalizador químico para ser considerado como tal;

- en segundo lugar, algunos datos referentes a la actividad de los enzimas que, en nuestra opinión, hacen sospechar que las proteínas con función enzimática no reúnen las condiciones requeridas para ser consideradas catalizadores químicos ;

- en tercer lugar, la interpretación de la función enzimática que se deduce de considerar los datos relativos a la misma desde la perspectiva de la teoría de unidades de nivel ; y

- en cuarto lugar, algunas de las consideraciones que se deducen de la interpretación anterior y de las perspectivas que abre para la bioquímica y, en general, para la biología.

La catálisis química.

En este apartado no podemos tratar extensamente todas las características de la catálisis, sólo vamos a exponer, someramente, las que debe reunir cualquier molécula o sistema molecular para ser considerado como catalizador. Con este objetivo, nos parece conveniente comenzar por hacer unas breves consideraciones sobre los mecanismos de las reacciones químicas.

En una reacción química del tipo $A + B \rightleftharpoons C + D$, la velocidad de reacción (número de reacciones por unidad de tiempo), en el sentido $A + B \longrightarrow C + D$, viene dada por una expresión del tipo : $v_1 = Z_1 \cdot P_1 \cdot [A]_0 \cdot [B]_0 \cdot e^{(-Q_1/RT)}$. Expresión en la que $[A]_0$ y $[B]_0$ representan las concentraciones iniciales de las correspondientes especies moleculares ; P_1 y Z_1 son dos coeficientes de proporcionalidad que representan, respectivamente, la frecuencia de pares de moléculas A y B que se encuentran en la

¹ En F. Cerdón, 1994. Se puede encontrar una exposición ordenada de estos argumentos.

² Por lo tanto, queda fuera de los objetivos de este trabajo hacer una crítica exhaustiva de la interpretación de la función enzimática como catálisis química. Dado el enorme desarrollo de la enzimología tal crítica debería desarrollar críticas parciales a todas y cada una de las explicaciones que la enzimología ha desarrollado sobre tal supuesto, lo que, por su extensión, queda fuera de la intención de esta ponencia.

posición relativa ³ adecuada para que tenga lugar la reacción, y la frecuencia de choques entre pares de moléculas A y B. En consecuencia, el producto $Z_1 \cdot P_1 \cdot [A]_0 \cdot [B]_0$, representa el número de colisiones ⁴ entre pares de moléculas A y B que se dan en la posición adecuada para que pueda tener lugar la reacción. En cuanto al factor $e^{(-Q_1/RT)}$ ⁵ representa la fracción de pares de moléculas A y B con una energía relativa superior a una dada, Q_1 , a la que se denomina energía de activación de la reacción. Como conclusión podríamos decir que para que dos moléculas, A y B, reaccionen es necesario que :

- que choquen,
- que lo hagan en la posición adecuada,
- y con una energía suficiente, superior a la de activación (Q_1).

Conviene detenerse, aunque sea brevemente, en el significado del último de los factores señalados ($e^{(-Q_1/RT)}$). Cuando el resto de las condiciones permanecen constantes, la velocidad de reacción crece exponencialmente al aumentar la temperatura según la expresión $v = k e^{(-Q_1/RT)}$ (como se representa en la Figura 1). Como hemos indicado, esta relación entre velocidad de reacción y temperatura se interpreta suponiendo que Q_1 representa un requisito energético mínimo para que la reacción tenga lugar, esto es, como la energía mínima de que deben disponer dos moléculas, en el momento del choque, para que reaccionen.

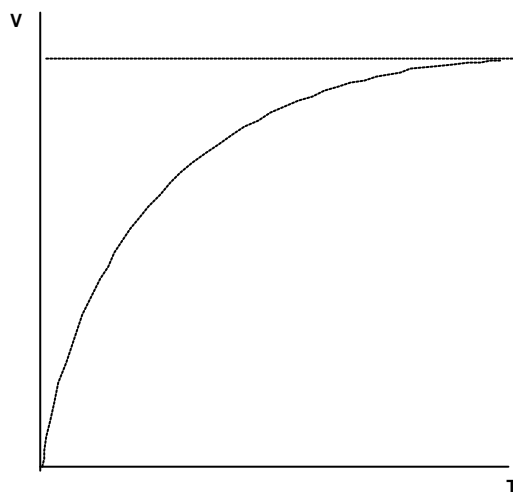


Figura 1

Así, se supone que, en el curso de la transformación de reaccionantes (A + B) en productos (C + D), se pasa, necesariamente, por un estado intermedio (AB*), estado de transición o estado activado, cuya energía interna es superior tanto a la correspondiente a las moléculas de los reaccionantes como a las de los productos (ver la Figura 2), de modo que, para que las moléculas A y B reaccionen entre sí deben disponer de un exceso de energía (Q_1) que, sumado a sus propias energías internas, les permita alcanzar la energía interna correspondiente al estado de transición.

Hay que suponer, además, que este suplemento de energía, en cuanto que depende de la temperatura, procede de la energía cinética (de traslación, vibración o rotación) de las moléculas

³ El término posición es una imprecisión, conscientemente utilizada, a la que habría que dotar de contenido. En este factor, junto con aspectos espaciales y estructurales, habría que considerar también, por ejemplo, las interacciones de tipo electrostático entre las distintas partes de las moléculas reaccionantes, caracteres, todos ellos, difícilmente cuantificables.

⁴ Hablar de colisiones o choques entre moléculas no deja de ser una analogía, referida al comportamiento de los cuerpos macroscópicos, hay que entender que con esta denominación nos referimos a los encuentros entre moléculas y a las interacciones que tienen lugar, en ellos, entre las diferentes partes de las moléculas.

⁵ Expresión en la que R es la constante de los gases perfectos $R=0,08206$ atmósferas · litro / °K · mol ; e es la base de los logaritmos naturales $e = 2,71828$, T representa a la temperatura, y Q es un valor, característico de cada reacción, al que se denomina energía de activación de la reacción.

reaccionantes. Bajo este supuesto, en el proceso de cada reacción se pueden considerar dos fases (como se indica en la Figura 2):

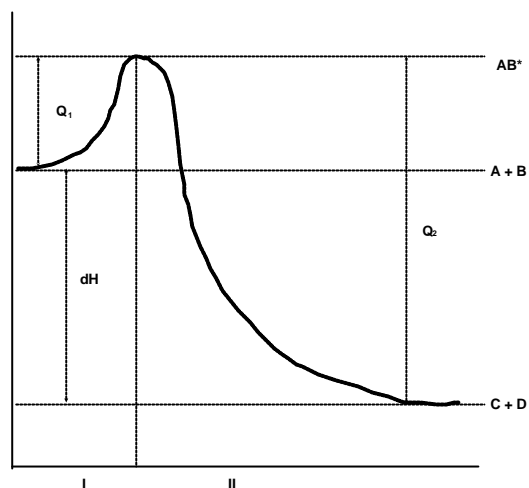


Figura 2

Por otra parte, la energía de activación sugiere una interpretación del proceso de la reacción en términos de termodinámica. Esta interpretación supone la existencia de un estado de transición (AB^*) intermedio entre la configuración de las moléculas correspondientes antes de la reacción ($A + B$), y la de los productos de la reacción ($C + D$), con una energía interna superior a la de las configuraciones de los substratos y de los productos. De acuerdo con esto, el proceso tendría lugar en dos fases (Figura 2).

I. Una primera, en la que las moléculas reaccionantes ($A + B$) alcanzan la energía interna correspondiente al estado de transición (AB^*) a expensas de sus propias energías internas y de una cantidad Q_1 de energía procedente de sus respectivas energías cinéticas.

II. Una segunda fase en la que el estado de transición (AB^*) se transforma en los productos, liberando, como energía cinética de estas moléculas, una cantidad Q_2 de energía.

En la reacción en sentido contrario $C + D \longrightarrow A + B$, cuya velocidad de reacción viene dada por la expresión :

$$v_2 = Z_2 \cdot P_2 \cdot [C]_0 \cdot [D]_0 \cdot e^{-(Q_2/RT)},$$

tendría lugar el proceso inverso en el que se pueden diferenciar otras dos fases (Figura 3):

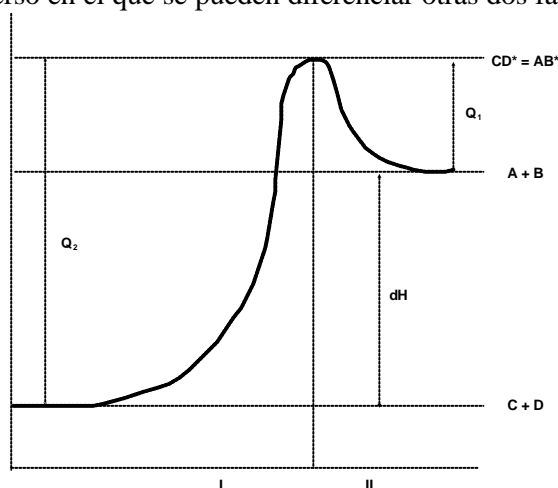


Figura 3

I. En la que las moléculas reaccionantes (ahora, $C + D$) alcanzan el estado de transición ($CD^* = AB^*$) consumiendo para ello una cantidad Q_2 de energía procedente de sus respectivas energías cinéticas.

I. Una segunda fase en la que el estado de transición (AB*) se transforma en los correspondientes productos (A + B) liberando, como energía cinética de los mismos, una cantidad Q_1 de energía.

Lógicamente, el balance energético de una reacción en el sentido $A + B \longrightarrow C + D$, ($Q_2 - Q_1 = \Delta H$), es igual y de sentido contrario al de una reacción en el sentido inverso $C + D \longrightarrow A + B$, ($Q_1 - Q_2 = -\Delta H$).

Si consideramos la situación de equilibrio químico, en la que el número de reacciones en ambos sentidos se compensa ($v_1=v_2$), tendremos la siguiente igualdad:

$$Z_1 \cdot P_1 \cdot [A]_e \cdot [B]_e \cdot e^{(-Q_1/RT)} = Z_2 \cdot P_2 \cdot [C]_e \cdot [D]_e \cdot e^{(-Q_2/RT)}$$

expresión en la que $[A]_e$, $[B]_e$, $[C]_e$ y $[D]_e$ representan las correspondientes concentraciones en el equilibrio. Si reordenamos esta expresión se obtiene la siguiente :

$$Z_1 \cdot P_1 \cdot e^{(-Q_1/RT)} / Z_2 \cdot P_2 \cdot e^{(-Q_2/RT)} = [C]_e \cdot [D]_e / [A]_e \cdot [B]_e = K_e$$

donde K_e recibe el nombre de constante de equilibrio de la reacción. Sus dos expresiones matemáticas reflejan los dos aspectos del equilibrio químico :

$K_e = [C]_e \cdot [D]_e / [A]_e \cdot [B]_e$, nos indica que, en el equilibrio químico, las concentraciones de las moléculas reaccionantes y productos se mantienen constantes, aunque se sigan dando transformaciones en ambos sentidos (lógicamente, en el mismo número), como se puede comprobar utilizando isótopos radiactivos.

$K_e = Z_1 \cdot P_1 \cdot e^{(-Q_1/RT)} / Z_2 \cdot P_2 \cdot e^{(-Q_2/RT)} = (Z_1 \cdot P_1 / Z_2 \cdot P_2) \cdot e^{(\Delta H/RT)}$, refleja el hecho de que el equilibrio químico represente un equilibrio termodinámico, en el que no hay pérdida ni ganancia neta de energía, la cantidad de calor ($Q_2 - Q_1 = \Delta H$) aportada por cada reacción en el sentido $A + B \longrightarrow C + D$, se compensa exactamente con la cantidad consumida por cada reacción en sentido contrario ($Q_1 - Q_2 = -\Delta H$).

Aunque estas consideraciones están hechas pensando en una reacción química bimolecular (colisional) son, en lo esencial, igualmente válidas para transformaciones monomoleculares (intramoleculares), en las que la reacción no depende directamente de los choques entre moléculas (aunque estos puedan jugar un papel en la desestabilización de las moléculas). En estas transformaciones es de suponer que el número de choques y la posición de las moléculas en ellos contribuyen poco a que la reacción tenga lugar, y lo mismo cabe pensar de la contribución de la energía cinética de traslación de las moléculas para que éstas alcancen el estado activado (salvo en lo que tal energía colabore, a través de choques, a la desestabilización de dichas moléculas). Hay que pensar, pues, que el estado activado, en este tipo de reacción, se alcanza, fundamentalmente, a expensas de otros tipos de energía cinética molecular (de vibración o de rotación).

Generalizando, se puede decir que, en la medida en que una reacción química mantenga una dependencia de la temperatura del tipo descrito (el representado por una ecuación del tipo $v = k \cdot e^{(-Q/RT)}$), debemos pensar que el calor colabora a que las moléculas reaccionantes alcancen el estado activado y, en consecuencia, que la energía interna de este estado se logra a expensas de algún tipo de energía cinética molecular, sea esta de traslación, vibración o rotación.

Los catalizadores

Para que una molécula, o un sistema de ellas, pueda ser considerado un catalizador es necesario, por una parte, que acelere la reacción y, por otra parte, que no cambie en el transcurso de la misma. El mecanismo de la catálisis, cualquiera que sea, no puede suponer gasto alguno (ni energético, ni material) por parte del catalizador. Por lo tanto, un catalizador no puede cambiar el equilibrio químico de una reacción ya que, por tratarse de un equilibrio termodinámico, cualquier desplazamiento del mismo supone un gasto de energía. Como consecuencia, si un catalizador aumenta la velocidad de la reacción en un sentido debe aumentarla, en la misma proporción, en el contrario ; esto es, se debe cumplir que $v_1/v_2 = v'_1/v'_2$ (donde v'_1 y v'_2 son las velocidades de la reacción en presencia del catalizador). En definitiva, una

reacción catalizada tiende a la misma situación de equilibrio que sin catalizar, pero alcanza dicha situación más rápidamente.

Los catalizadores pueden aumentar la velocidad de una reacción modificando cualquiera de los factores de los que ésta depende, siempre y cuando los efectos sean los mismos en los dos sentidos de la reacción. Así, los catalizadores pueden proceder, por ejemplo, facilitando el número de choques o la posición adecuada de las moléculas reaccionantes en los mismos (siempre, claro está, en igual proporción en los dos sentidos de la reacción). Otra de las formas en que puede actuar un catalizador es disminuyendo el nivel energético del estado activado (como se indica en la figura 4, en la que la línea discontinua representa el progreso de la reacción catalizada), de esta manera disminuyen, en la misma proporción, las energías de activación en los dos sentidos de la reacción sin que se modifique su diferencia ($Q_1 - Q_2 = Q'_1 - Q'_2 = \Delta H$) y, consecuentemente, aumenta en igual proporción el número de moléculas de reaccionantes y de productos con energía cinética suficiente para superar la barrera energética representada por el estado de transición (estado activado).

Muchos catalizadores modifican simultáneamente varios de los factores citados (por ejemplo, una posición más favorable de las moléculas en el momento del choque es de esperar que disminuya la energía requerida para alcanzar el estado activado). Probablemente, esta sea la forma en que actúan algunos catalizadores de adsorción, produciendo un aumento de la velocidad de reacción como consecuencia:

1. de aumentar el número de choques entre reaccionantes (aumentar la concentración eficaz de los mismos),

2. de favorecer la posición adecuada de las moléculas reaccionantes en el choque (disminuir la dificultad entrópica de la reacción)

3. y de disminuir los requerimientos energéticos de la reacción. Cuando esto ocurre, es posible, que el catalizador, simultáneamente, provoque una restricción de los movimientos de las moléculas reaccionantes, disminuyendo, en consecuencia, su energía cinética de traslación (y, tal vez, las de vibración y rotación), pero, cualquiera que sea el mecanismo de la catálisis, en la medida en que la velocidad de reacción catalizada mantenga una relación de tipo exponencial respecto a la temperatura (del tipo, $v = k \cdot e^{-(Q/RT)}$), la energía necesaria para que las moléculas reaccionantes alcancen el estado de activación debe proceder de su energía cinética (éste parece ser el significado de la relación $v = k \cdot e^{-(Q/RT)}$).⁶

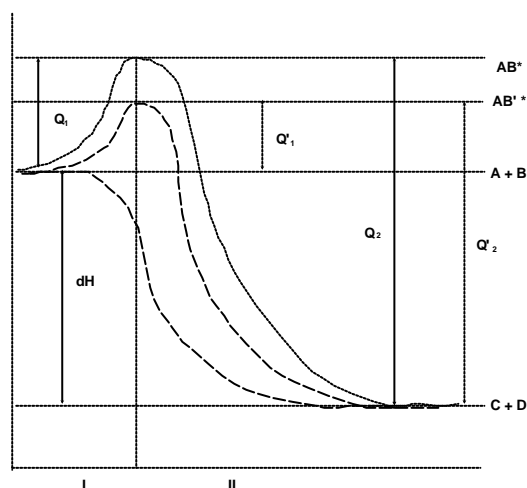


Figura 4

La afirmación anterior es válida siempre. Únicamente en el caso en que la catálisis anulase totalmente la barrera energética que representa el estado de activación (si $Q_1 = 0$) la reacción tendría

⁶ En algunos tipos de reacciones (por ejemplo, las sensibles a la luz) el estado de activación se alcanza a expensas de una energía diferente a la térmica, pero en estos casos la velocidad de reacción depende de la temperatura de forma, también, diferente a la señalada.

lugar sin consumir energía cinética de las moléculas reaccionantes ⁷(como representa la línea fina continua de la Figura 4), pero en este caso la velocidad de la reacción en ese sentido (v_1) perdería su dependencia exponencial respecto a la temperatura ⁸:

$$v_1 = P_1 Z_1 [A]_e[B]_e e^0 = P_1 Z_1 [A]_e[B]_e$$

Las transformaciones enzimáticas

Para explicar el funcionamiento de los enzimas, se describen cuatro tipos principales de mecanismos (véanse, por ejemplo, Walsh, 1977 y Jencks, 1969, 1975, 1981, Reuben, 1971, Hanson y Rose, 1977):

- La contribución entrópica a la catálisis.
- La catálisis por intermediarios covalentes.
- La catálisis general ácido-base.
- La catálisis por tensión o deformación.

Vamos a considerar brevemente algunos de los datos disponibles referentes a estos mecanismos postulados.

Bajo la denominación de “contribución entrópica” a la catálisis se reúnen los datos relativos, fundamentalmente, a tres aspectos: la aproximación de los substratos entre sí; la mayor duración del complejo enzima-substrato respecto a la de un choque simple entre moléculas; y la restricción de los movimientos de los substratos. Entre otras cosas parecen probados los siguientes hechos:

- Dentro del centro activo los metabolitos permanecen quietos, en una posición fija, de modo que desaparecen incluso los movimientos intramoleculares de rotación y vibración.

- La posición de un metabolito respecto a los demás es fija y muy precisa y las distancias entre los átomos de diferentes moléculas son equivalentes a las distancias entre átomos de la misma molécula (del orden del Å).

- El tiempo de duración del proceso enzimático es entre 10^6 y 10^9 veces mayor que el de una reacción química producida por colisión molecular.

Respecto al segundo grupo de mecanismos citados, los que se refieren a los intermediarios covalentes, sólo vamos a señalar que en el transcurso de algunas transformaciones enzimáticas se ha observado la formación de uniones covalentes transitorias entre los metabolitos y los coenzimas o algún grupo prostético del enzima.

El tercer grupo de mecanismos se refiere a la catálisis general ácido-base, que supone la cesión, observada en numerosos casos, de hidrogeniones por parte del enzima a los metabolitos. Como indicamos más adelante, en nuestra opinión, este hecho puede ser más general de lo que se supone.

El último grupo de mecanismos se refiere a que, en muchos casos, se ha observado que los metabolitos, dentro del centro activo, no se encuentran en su estado de mínima energía, sino que parecen estar sometidos a tensiones y deformaciones que, verosímilmente, colaboran a facilitar la reacción.

Hay que señalar que, aunque todos los mecanismos postulados surgen de observaciones más o menos puntuales, algunos de entre ellos (por ejemplo, los relativos a la posición de los metabolitos dentro del centro activo, el estado de congelación de sus movimientos), en nuestra opinión, se deben considerar características generales de todas las transformaciones enzimáticas, mientras que otros (por ejemplo, la existencia de intermediarios covalentes) sólo tienen lugar en algunas de ellas.

⁷ Este supuesto se correspondería con un sistema en el cual dos moléculas no tuvieran que cumplir ningún requisito energético para reaccionar, de forma que lo hiciesen, independientemente de su energía cinética, siempre que se produjese su colisión en la posición adecuada.

Si tuviéramos la misma situación para una reacción monomolecular habría que concluir que las moléculas iniciales son inestables a cualquier temperatura y, por consiguiente, sería de esperar que el equilibrio de la reacción estuviera muy desplazado hacia la formación de productos, la presencia de moléculas iniciales (reaccionantes) sólo estaría mantenida por su producción a partir de las moléculas productos (que sí depende de la temperatura).

⁸ La velocidad de reacción (v_1) seguiría dependiendo de la temperatura en cuanto que el número de choques (P_1) depende de la temperatura, también, pero esta dependencia no es de tipo exponencial.

Hay que destacar un último aspecto en lo referente a los mecanismos propuestos para explicar la acción enzimática: en todas las transformaciones enzimáticas para las que se dispone de suficiente información, la transformación de los metabolitos se puede resolver en una secuencia de estados intermedios en la transformación separados entre sí por movimientos lineales de pares de electrones ⁹, secuencia que es fija y característica para cada una de las transformaciones enzimáticas estudiadas. En nuestra opinión, este hecho debe considerarse como una característica general de las transformaciones enzimáticas, esto es, pensamos que todas ellas se pueden resolver en una secuencia de ese tipo.

Algunos de estos datos, en concreto los relativos a la tensión y deformación a que son sometidos los metabolitos, a su estricta ordenación dentro del centro activo y a la paralización de sus movimientos ¹⁰, en nuestra opinión, no corresponden al comportamiento esperado de un catalizador. Veamos.

- Dado que los metabolitos en la disolución se mueven, tanto unos respecto a otros (movimientos de translación y rotación molecular), como con movimientos intramoleculares (de vibración y rotación interna), el hecho de que en el momento en que tiene lugar la reacción molecular, los metabolitos en el centro activo del enzima, permanezcan quietos, supone que deben ser frenados, orientados y desplazados, hasta ser situados, quietos, en el centro activo, lo que tiene que requerir un gasto de energía. (Lo mismo cabe decir, cuando se produce, de la tensión y deformación de los metabolitos.) Además, este gasto no será fijo ya que no es fijo el estado energético de partida de las moléculas, que se mueven desordenadamente dentro de la disolución.

- Además, si, como parece, los metabolitos en el centro activo están quietos y próximos, por un lado, parece evidente que la dificultad entrópica de la reacción, la debida a las posiciones relativas de los reaccionantes, disminuye y, con ello, se facilita la reacción, pero, por otro lado, desaparece, también, la fuente de energía que permite alcanzar a los reaccionantes la energía interna correspondiente al estado activado que, en una reacción no enzimática, se salva a costa de energía cinética de los reaccionantes. ¿Cuál puede ser el mecanismo que permita alcanzar el estado de activación en dos moléculas quietas ?

- Finalmente, si las moléculas, antes de tener lugar la reacción, deben pasar de un estado energético variable a otro de mínima energía, no se justifica, en nuestra opinión, la dependencia exponencial de la velocidad de reacción respecto a la temperatura. ¿Cuál puede ser en este caso el papel de la temperatura ?

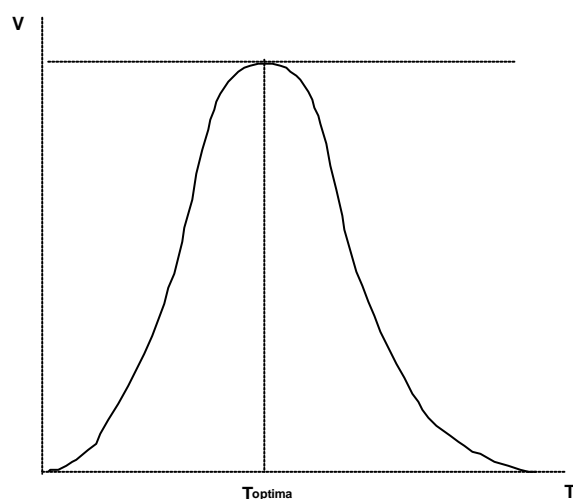


Figura 5

⁹ Salvo en aquellas transformaciones en las que intervienen coenzimas del tipo de los hemo (clorofilas, citocromos, cobalamina,...) donde el movimiento puede afectar a electrones individualizados.

¹⁰ Todos ellos son rasgos característicos de la transformación enzimática, que sin duda contribuyen a asegurar el encuentro en la posición adecuada de los metabolitos reaccionantes, aumentando la concentración eficaz y disminuyendo la dificultad entrópica de la reacción.

De hecho, la velocidad de las reacciones enzimáticas no crece exponencialmente con la temperatura, sino que, para cada transformación, existe una temperatura óptima para la que la velocidad de reacción es máxima (véase la Figura 5) por encima de la cual la velocidad disminuye.

La enzimología actual interpreta esta curva como el resultado de dos procesos independientes y simultáneos de signo contrario (Laidler y Peterman, 1983): por una parte, la velocidad de reacción, en la reacción enzimática, tendría una dependencia de la temperatura, típica, de tipo exponencial (como la mostrada en la Figura 1); y simultáneamente, según esta interpretación, se daría un proceso de inactivación térmica del enzima que se opondría al efecto anterior (Figura 6). (Este segundo proceso también mostraría una dependencia de tipo exponencial respecto a la temperatura¹¹).

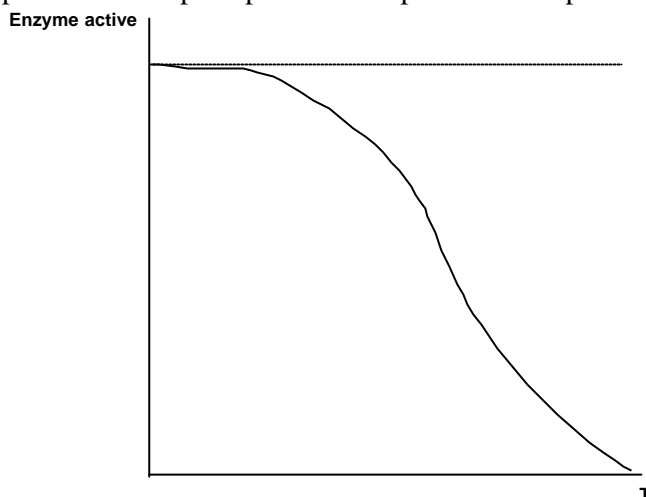


Figura 6

El resultado de la composición de estos dos procesos sería un comportamiento del tipo descrito en la Figura 5.

Esta interpretación de la relación entre velocidad de la reacción y temperatura, en nuestra opinión, es consecuencia de la interpretación del enzima como catalizador (que, a su vez, viene impuesta por la de la proteína como molécula). Nos parece paradójico, por ejemplo, que la baja velocidad de reacción que la mayoría de las transformaciones enzimáticas tienen a bajas temperaturas se atribuya a la escasa reactividad que los metabolitos presentan a esas temperaturas y se corresponda, según esta interpretación, con una elevada actividad del enzima. La crioenzimología nos suministra algunos datos que ponen de manifiesto más claramente esta paradoja: Mediante la combinación de criosolventes y bajas temperaturas se ha conseguido mantener la actividad de numerosos enzimas a temperaturas alrededor de -100°C . En estas condiciones las transformaciones enzimáticas tienen lugar tan lentamente que, recurriendo a estas técnicas, se pueden estudiar los pasos intermedios de la transformación, pudiendo aislarse los complejos enzima-metabolito correspondientes a los metabolitos intermedios. De acuerdo con la interpretación que estamos considerando, esta lenta velocidad de reacción se debe corresponder con una elevadísima actividad enzimática, casi la máxima, que se vería frenada por la escasa reactividad de los metabolitos. Por otra parte, esta explicación entra en contradicción con la que se hace del papel de los criosolventes en estos experimentos, que parecen cumplir una función conservadora de la estructura del enzima (y, con ello, de su actividad) que tiende a perderse con las bajas temperaturas (Fink y Geeves, 1983) ¿Cómo puede, la actividad enzimática a bajas temperaturas, tender a perderse y, simultáneamente, ser cada vez más elevada?

Por otra parte, si la velocidad de reacción dependiera, como se propone, de la energía cinética de los metabolitos (de la temperatura de la disolución) de la misma forma que lo hace en las reacciones no enzimáticas, sería de esperar que esa energía se usara para desencadenar la reacción. No sólo no parece

¹¹ De acuerdo a esta interpretación la energía de activación de la reacción sería mucho menor que la energía de inactivación del enzima, esto explicaría que el efecto de ésta sólo se dejaría sentir a partir de una temperatura relativamente elevada.

ser así, sino que, si los metabolitos van a ser frenados al entrar en el centro activo, parece que cuanto mayor sea su energía cinética mayor será el trabajo requerido para inmovilizarlos, esto es, mayor será la dificultad energética asociada a su transformación. En cualquier caso, no entendemos qué relación puede guardar el estado de movimiento de los metabolitos (su energía cinética) antes de entrar en contacto con el enzima con su transformación en el centro activo, si la entrada va seguida siempre de su desaceleración hasta quedar inmovilizados en el centro activo.

Así pues, el comportamiento de la velocidad de reacción respecto a la temperatura en las transformaciones enzimáticas no justifica, en nuestra opinión, una interpretación cinética de las mismas como la propuesta para las reacciones no enzimáticas.

Un argumento relacionado con el anterior es el que se refiere a la vida media de los enzimas. La conservación de los enzimas, una vez purificados, se lleva a cabo a bajas temperaturas, esto es, en condiciones en que la actividad enzimática es nula o muy pequeña, a estas temperaturas la vida media de un enzima puede ser desde varias horas a años. Cuando las proteínas con función enzimática se mantienen a temperatura ambiente y su capacidad funcional es normal, su vida media es mucho menor. Walsh (1977) da como ejemplo una vida de 24 horas para un enzima con un número de recambio de $10^6/\text{sg.}$, lo que da un número total de transformaciones de $864 \cdot 10^9$ por partícula de enzima. Walsh interpreta que un número tan enorme de transformaciones justifica el carácter de catalizador del enzima. Ahora bien, siendo rigurosos, el número de reacciones en las que puede intervenir una molécula de un catalizador, puesto que no se consume en el ciclo reactivo, debe de ser infinito. El hecho de que el enzima pierda su capacidad catalítica al cabo de unas horas de actividad, indica que no se comporta de esa manera.

Existe aún otro aspecto de la transformación enzimática que, en nuestra opinión, supone una dificultad añadida para la interpretación del enzima como catalizador, nos referimos a la distinta naturaleza que parecen tener las dos fases de la transformación, cuando ésta es llevada a cabo por enzimas. En una reacción no enzimática:



el paso de los reaccionantes (A+B) al estado de transición (AB*) consume una energía Q_1 , que se obtiene de la energía cinética de A y B. A su vez, en la segunda parte de la reacción, se libera una energía Q_2 en forma de energía cinética de los productos. De forma que el balance final de energía será :

$$dE = Q_1 - Q_2.$$

Si consideramos la misma reacción pero con intervención de un enzima (E) :



los mecanismos descritos, al menos los referentes a la tensión y deformación de los metabolitos, la congelación de sus movimientos de traslación, vibración y rotación, su orientación y colocación en el centro activo, parecen sugerir que la primera parte de la transformación requiere un aporte de energía que (en cuanto que se pasa de unas condiciones variables : la llegada de los substratos al enzima con velocidad y en posición aleatoria, a unas condiciones, más o menos, fijas : los substratos ordenados, situados en la posición adecuada y activados, dentro del centro activo) parece que tiene que ser variable; mientras que la segunda parte (en la que se parte de unas condiciones fijas : los substratos activados en el centro activo, para llegar a otras que, al menos en principio, también, son fijas : los productos abandonados en la disolución) parece consistir en un proceso constante. Cualquier interpretación del enzima como catalizador debe explicar cómo se puede recuperar en la segunda parte, aparentemente un proceso fijo, la cantidad de energía consumida en la primera parte, variable de reacción a reacción.

Interpretación de la función enzimática a partir de la teoría de unidades de nivel de integración

Desde el punto de vista de la Teoría de unidades de niveles de integración, esto es, considerando a las proteínas como unidades de nivel directamente supramolecular, las transformaciones enzimáticas no son reacciones catalizadas. Evidentemente, los enzimas aceleran las transformaciones en que intervienen, pero, en nuestra opinión, esto debe suponer, por su parte, la realización de un trabajo. A continuación, consideramos, desde este enfoque, algunos aspectos de la transformación enzimática.

Balance energético de las transformaciones enzimáticas.

Desde un punto de vista energético (y considerando las condiciones de experimentación *in vitro*, esto es, metabolitos y enzimas disueltos), el desarrollo de cada transformación enzimática, según esta interpretación, podría ser representado en coordenadas de reacción como en la Figura 7 ¹².

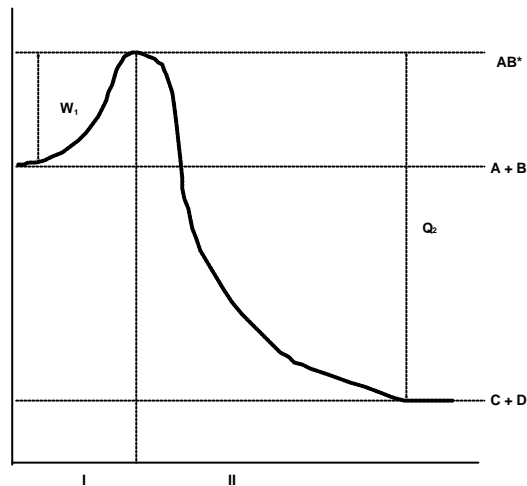


Figura 7

I. En la primera parte de la transformación, la proteína realiza un trabajo recogiendo los substratos de la disolución (A+B), desplazándolos, frenando sus movimientos de translación, rotación y vibración, y activándolos para que alcancen el estado de transición (AB*). Cuando la transformación tiene lugar *in vitro*, este trabajo, en nuestra opinión, debería ser variable de una reacción elemental a la siguiente, en cuanto que son diferentes las condiciones de llegada (velocidad, posición, etc..) de los substratos de una a otra vez.

II. En la segunda parte de la transformación las moléculas reaccionantes pasan del estado activado (AB*), con un contenido energético elevado, a los metabolitos productos (C+D), liberando calor en la disolución.

Hay que señalar, aunque en la Figura 7 no se manifieste, que la primera etapa debe durar mucho más que la segunda e incluye una sucesión de acciones enzimáticas sobre la molécula (captación, desplazamiento, activación), mientras que la segunda etapa consiste en la reacción molecular en sentido estricto y tiene la duración de una vibración molecular, del orden de 10^{-13} seg.. Este hecho es un reflejo de que la primera etapa tiene lugar entre dos niveles distintos, uno manejado por el otro, mientras que la segunda tiene lugar enteramente dentro del nivel molecular ; y, por otra parte, justifica la mayor duración de la transformación enzimática, respecto a la no enzimática.

Otro rasgo a destacar de esta interpretación es que, mientras que en las reacciones químicas no enzimáticas la primera y la segunda fase compensan sus energías estadísticamente, en el proceso enzimático ambas energías tienen un carácter distinto (una es trabajo enzimático y la otra calor molecular) por lo que no se pueden compensar. En un balance energético correcto de estas transformaciones habría

¹² En realidad el esquema de la Figura 7 correspondería a una transformación enzimática en la que sólo se diera un paso elemental (ver más adelante). En el caso más general de transformación enzimática se dan varios pasos elementales sucesivos, lo que supone varios procesos de activación de los metabolitos, llevados a cabo por el enzima, separados por otros tantos procesos de reacción entre los metabolitos. La curva de coordenadas de reacción tendría, en consecuencia, varios máximos, correspondientes a varias energías de activación.

que considerar por separado lo que ocurre en el enzima y lo que tiene lugar en el sistema molecular. Esto es, por un lado, el enzima realiza un trabajo (W) y no se recupera de él, por lo tanto, debe de sufrir un desgaste paulatino ; por otro, el sistema molecular (la disolución) recibirá un aporte de energía (Q).

Velocidad de reacción y temperatura en las transformaciones enzimáticas.

En cuanto a la curva representada en la Figura 5, en nuestra opinión, refleja un fenómeno de adaptación del enzima a la temperatura (que tiene su correspondencia por ejemplo, en la adaptación del metabolismo a la temperatura, en células y animales), pero no de forma estadística¹³, como debemos suponer que ocurre si atribuimos a la desnaturalización térmica del enzima un comportamiento ajustado a una ecuación del tipo $v=Ke^{-Q/RT}$. En nuestra opinión, la adaptación térmica debe afectar de forma parecida a la mayor parte de las partículas de enzima (una disminución de, por ejemplo, un 20% en la velocidad de reacción global, en nuestra opinión, refleja, en lugar de un 20% de partículas de enzima inactivas, una disminución de un 20% en la actividad de cada proteína enzimática). Según esta interpretación, cuanto más lejos se encuentre una proteína enzimática de su temperatura óptima (por encima o por debajo) menor será su actividad y, en consecuencia, la velocidad de reacción variará respecto a la T dando una curva en forma de campana alrededor de la T óptima (muy semejante a la que se obtiene variando el pH y que, a su vez, refleja la adaptación de la proteína al pH).

En cuanto a la desnaturalización térmica de los enzimas, la enzimología actual considera dos procesos :

- Un proceso reversible en el que, como consecuencia del calentamiento del enzima, se produce: 1) una pérdida de actividad enzimática cuando la T supera a la T óptima ; y 2) algunos cambios estructurales que afectan, sobre todo, a la estructura globular (terciaria) de la de la proteína y que se pueden registrar por ejemplo mediante técnicas de espectroscopia.

- Un proceso irreversible que tiene lugar a temperaturas en general altas y en un margen más o menos estrecho de temperatura y que se puede considerar un fenómeno brusco.

El primero de estos dos procesos habría que interpretarlo, en nuestra opinión, como un proceso de adaptación de la proteína a la T, y, como hemos señalado antes, afectaría por igual a todas las partículas enzimáticas (esto es, todas -ó casi todas- sufrirían cambios estructurales y, simultáneamente, cambios en su actividad enzimática).

Así pues, nos encontramos con dos interpretaciones diferentes del comportamiento de la velocidad de reacción en función de la temperatura : la vigente, como combinación de dos efectos independientes contrapuestos (aumento de la velocidad de reacción como consecuencia del aumento de temperatura y progresiva desnaturalización térmica del enzima) ; y la que acabamos de exponer. Por ejemplo, para los puntos A, B y C, señalados en la Figura 8, tendríamos :

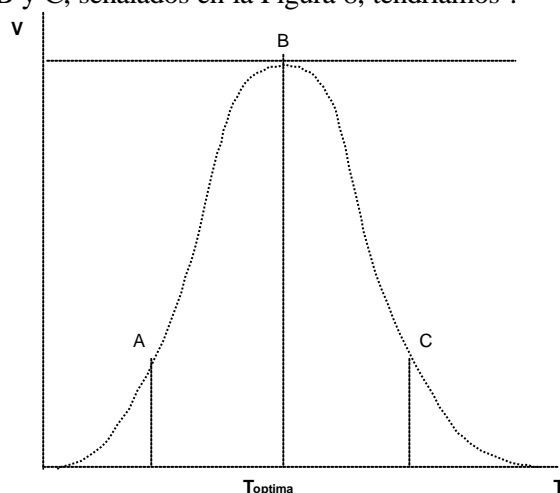


Figura 8

¹³ Según esta interpretación, la disminución de la velocidad de reacción que acompaña al aumento de temperatura, una vez superada la “óptima”, se debe atribuir a que haya más partículas de enzima inactivas -desnaturalizadas.

En A, según la interpretación vigente, la baja velocidad de reacción es la consecuencia de una gran proporción de enzimas, plenamente activos, que actúan sobre unos substratos poco reactivos, todo ello como consecuencia de las bajas temperaturas. Para nosotros, por el contrario, en A la situación refleja la acción de la mayor parte, si no todo, del enzima con una actividad muy baja.

Si consideramos el enzima como un catalizador, la situación representada en B es consecuencia de la combinación de una proporción de enzima activo menor que en A, favorecida por unos substratos más activados térmicamente (lo que, en nuestra opinión, se contradice con la congelación de movimientos del substrato en el centro activo, observada experimentalmente). Según nuestra interpretación, en B tendríamos la mayor parte del enzima actuando con la mayor intensidad.

De acuerdo con la interpretación vigente, la baja actividad en C se debe a que queda muy poca cantidad de enzima activo, que actúa sobre un substrato muy activado térmicamente. En nuestra opinión, en C estaría actuando la mayor parte del enzima con una intensidad muy baja.

Los mecanismos de las transformaciones enzimáticas.

En cuanto al curso de cada transformación enzimática, el conocimiento que la bioquímica ha acumulado, a lo largo de este siglo, permite sacar las siguientes conclusiones, válidas para todas las transformaciones metabólicas:

1. tienen lugar en zonas específicas de proteínas globulares (los “centros activos”);
2. son elementales, esto es, en cada “centro activo” se produce, por vez, una transformación de sendas moléculas de metabolitos substratos en sendas moléculas de metabolitos productos;
3. en los citados “centros activos”, los metabolitos están siempre situados en una posición muy precisa en la que las distancias entre los átomos de las diferentes moléculas son del mismo orden que las distancias entre átomos contiguos dentro de una molécula (el del Å), además, todas las moléculas tienen impedidos sus movimientos.
4. Para todas las transformaciones enzimáticas para las que disponemos de datos suficientes se puede establecer una serie de pasos intermedios entre substratos y productos, cada uno de ellos separado del siguiente por un movimiento lineal de pares de electrones entre dos puntos del complejo formado por los metabolitos reaccionantes, lo que resuelve la acción enzimática en una secuencia, fija para cada función enzimática, de desplazamientos lineales de pares de electrones, característica de cada transformación¹⁴.

A partir de los datos anteriores, que, en nuestra opinión son aplicables a todas las funciones enzimáticas, es posible reconstruir el siguiente modelo general de transformación enzimática :

1. Los metabolitos captados por el enzima son conducidos al “centro activo” y situados en una posición característica muy precisa, la conveniente para que tenga lugar la transformación.
2. A continuación, el enzima activa los metabolitos actuando sobre ellos (con toda probabilidad, como señalamos más adelante, a través de la conveniente polarización de algunos grupos químicos correspondientes a ciertos restos aminoácidos del centro activo), produciendo una secuencia, fija para cada función enzimática, de desplazamientos de pares de electrones que provoca la rotura de algunos enlaces y la formación de otros y que concluye con la transformación de los metabolitos iniciales en otros, los productos.
3. Finalmente, los metabolitos producidos son sacados del “centro activo” que queda en la misma situación que al comienzo, esto es, disponible para una nueva transformación.

Con arreglo a esta descripción F. Cordón ha desarrollado un modelo de representación que puede aplicarse, sin exclusión, a todas las transformaciones metabólicas, lo que permite su comparación, fundamental para reconstruir su filogenia (como consideramos en otra ponencia, véase “Evolución del metabolismo celular”), y que también permite reconstruir razonablemente las secuencias de

¹⁴ Como vemos más adelante, a través del metabolismo comparado, esta secuencia se puede deducir razonablemente para cualquier función enzimática de las que hemos estudiado (F. Cordón 1990).

desplazamientos de pares de electrones características de funciones enzimáticas para las que no se dispone de suficientes datos directos (F. Córdón, 1990).

En este modelo (Figura 9), los metabolitos se representan por sus fórmulas desarrolladas o semidesarrolladas (según sea el nivel de detalle con el que se quiera analizar la transformación metabólica en cuestión), que se sitúan, unas respecto a otras, en una posición que intenta reflejar la que tiene lugar en el centro activo de la correspondiente proteína.

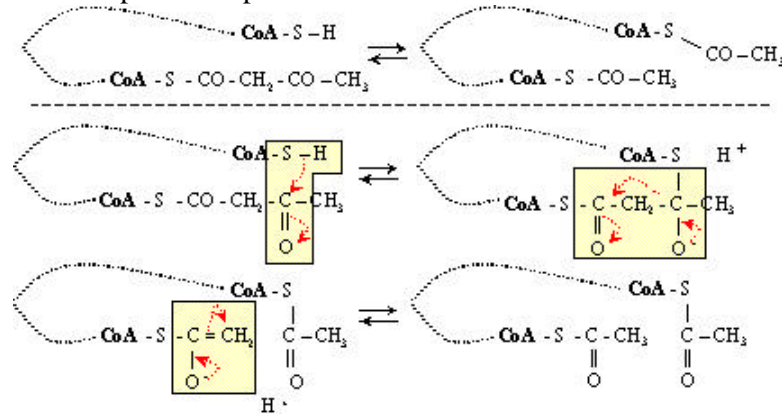


Figure 9. Modelo de representación

Como se explica en “Evolución del metabolismo celular”, los metabolitos pertenecientes a los sectores básicos del metabolismo celular presentan una porción constante a lo largo de las rutas metabólicas, característica para cada sector metabólico: un carboxilo en el sector de los aminoácidos, un fosforilo en el de los azúcares y un coenzima A en el de los ácidos grasos. Por razones que se exponen en la citada ponencia, Córdón denomina partes proximales a estas porciones fijas. Con el fin de mantener un criterio de orden en la representación de todas las transformaciones metabólicas, representamos siempre estas partes proximales hacia la izquierda, de forma que el resto del metabolito (su parte reactiva o distal) queda situado hacia la derecha. Finalmente se unen los extremos de las partes proximales con líneas discontinuas, lo que permite, por una parte, representar la unión de los metabolitos al centro activo del enzima, por fuerzas de van der Waalls, y, por otra, unificar cada paso de la representación.

Como hemos indicado, a partir de este modelo de representación es posible realizar una labor sistemática de comparación entre las transformaciones enzimáticas, lo que nos ha permitido:

1. Deducir las secuencias de desplazamientos de pares de electrones para las transformaciones para las que no disponíamos de datos suficientes, lo que, en nuestra opinión, apoya el carácter general del modelo de transformación propuesto.
2. Deducir la filogenia del núcleo central del metabolismo celular (como exponemos en “Evolución del metabolismo celular”).

Finalmente, aplicando este modelo, podemos incorporar el centro activo a la representación de la transformación (siempre que dispongamos de suficientes datos sobre su estructura), lo que nos permite hacernos una idea de la forma en que el enzima interviene en la transformación de los metabolitos. Tomemos como ejemplo la triosa-fosfato-isomerasa, enzima que gobierna la transformación de gliceraldehído en dihidroxiacetona (Figura 10) y sobre la que Knowles (1991) ha realizado una excelente revisión que aporta numerosos datos de detalle (este trabajo es, en nuestra opinión, uno de los pocos estudios de centros activos que ofrecen un nivel de detalle suficiente para hacer este tipo de consideraciones).

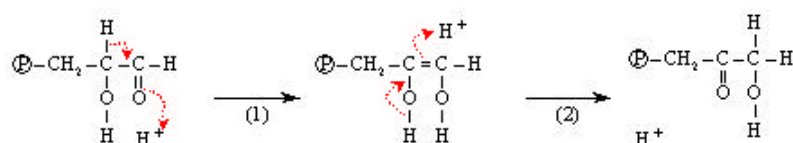


Figura 10. Transformación de gliceraldehído en dihidroxiacetona.

De los datos que nos ofrece Knowles podemos deducir que hay, al menos tres zonas del centro activo cuya estructura debe conservarse para que la transformación tenga lugar con normalidad: 1) un bucle formado por una secuencia de 10 restos de aminoácidos entre las posiciones 166 y 176, que parece suministrar una unión por puentes de hidrógeno al grupo fosforilo del sustrato; 2) un resto de glutámico (Glu 165) cuyo carboxilo libre está situado de manera que su oxígeno se encuentra a una distancia de alrededor de 3 Å de los carbonos C₁ y C₂ del gliceraldehído, cuando éste ocupa su lugar en el centro activo, y que, en la transformación, parece actuar como base y ser responsable de la sustracción del H⁺ en C₂; y 3) un resto de histidina (His 95) cuyo N en ε está a una distancia de 3 Å de los oxígenos unidos a los carbonos C₁ y C₂ y que parece actuar como polo electrófilo en la transformación (en la Figura 11 se recogen estos datos esquemáticamente)¹⁵.

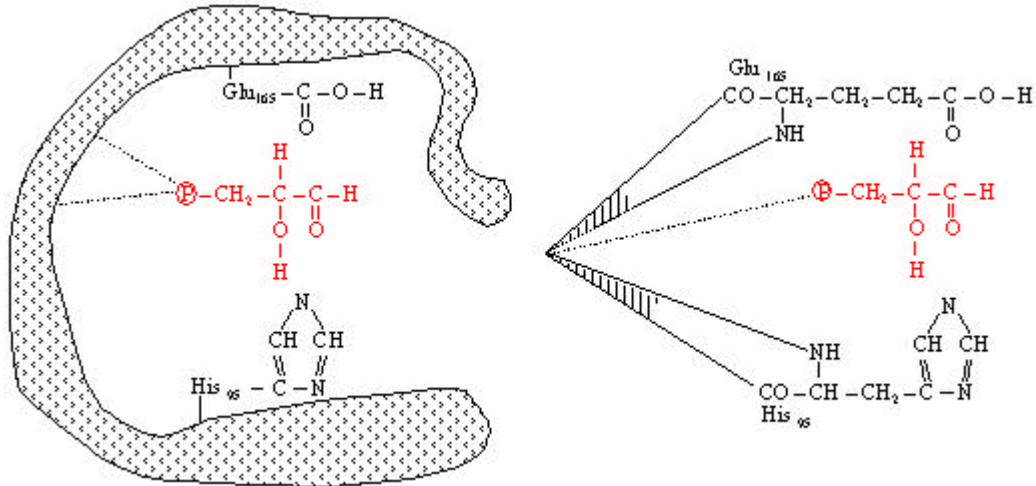


Figura 11. Esquema del centro activo de la triosa-fosfato-isomerasa ocupado por el gliceraldehído.

De todo ello, y teniendo en cuenta la secuencia de desplazamientos de electrones característica de esta transformación (representada en la Figura 10), se puede deducir que, durante la transformación, en el centro activo de este enzima se deben producir los cambios que representamos en la Figura 12. A partir de esta figura, parece sugerente pensar que cada uno de los pasos elementales (desplazamientos lineales de electrones) que podemos considerar en la secuencia de desplazamientos de pares de electrones que caracteriza a esta función enzimática se corresponde con (o, más precisamente, está provocado por) la polarización de dos puntos del centro activo (en nuestro ejemplo, el carboxilo del glutámico 165 y el amino en ε de la histidina 95), de forma que la propia secuencia de desplazamientos de pares de electrones dentro del metabolito sería la consecuencia de una secuencia, correspondiente, de polarizaciones de grupos químicos dentro del centro activo, como se representa en la Figura 13.

¹⁵ Se sabe, además, que la sustitución del glutámico 165 por aspártico (el oxígeno se aleja de su posición alrededor de 1 Å) hace que el enzima disminuya su actividad 1000 veces; si el glutámico es sustituido por alanina (el grupo carboxilo desaparece) la actividad del enzima disminuye 1000.000 de veces; cuando se cambia la histidina 95 por glutamina, la actividad disminuye 100 veces; y cuando la histidina es sustituida por asparraguina la actividad disminuye 10.000 veces.

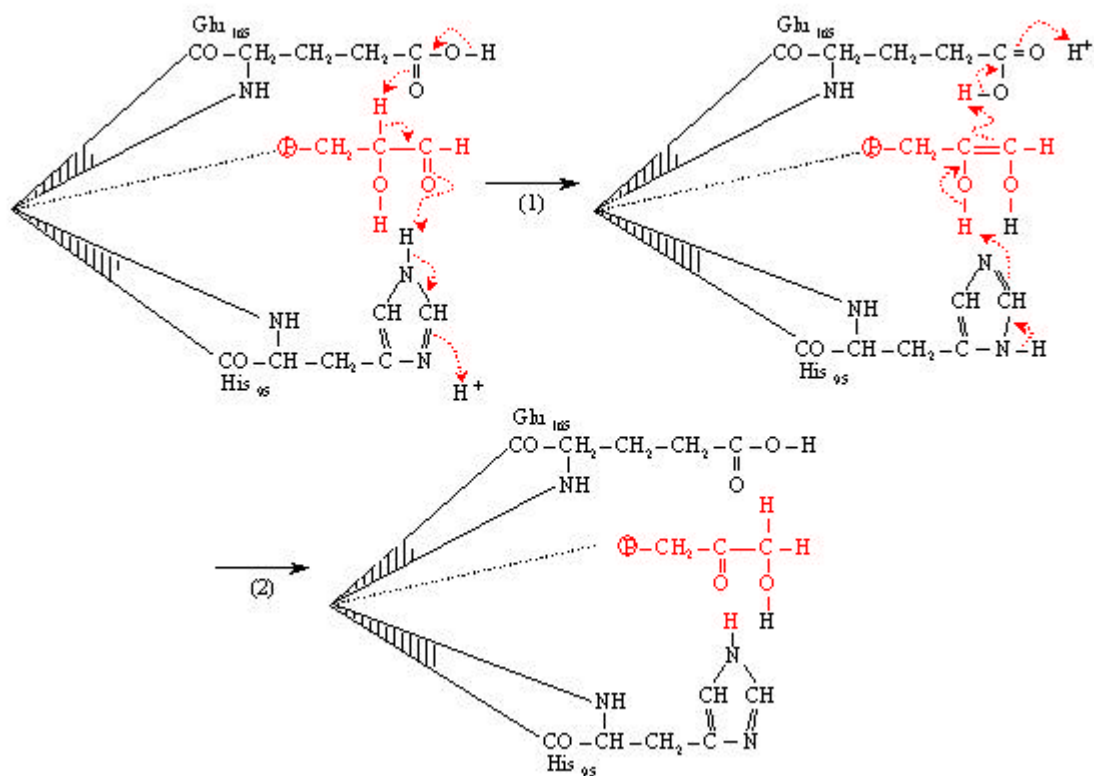


Figura 12. Transformación del gliceraldeído en dihidroxiacetona.

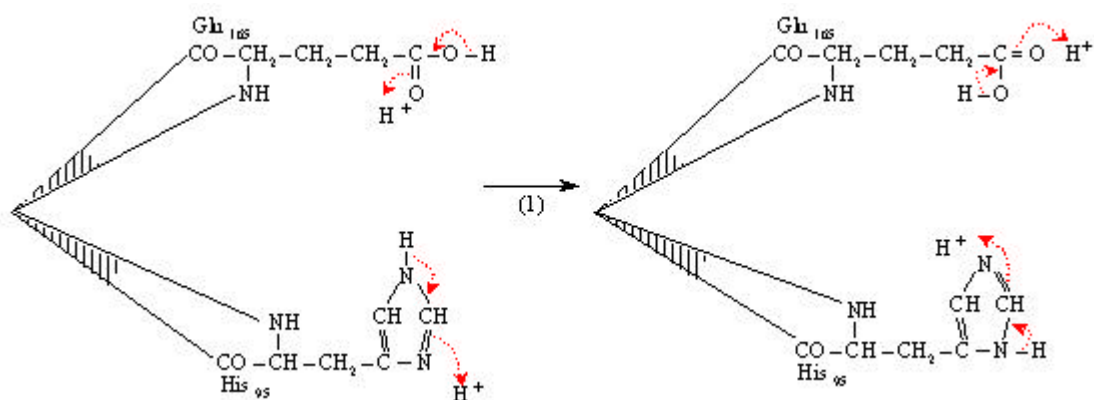


Figure 13. Triosa-fosfato-isomerasa : cambios en el centro activo.

Aunque los datos anteriores corresponden a la triosa-fosfato-isomerasa, en la medida en que la secuencia de movimientos de electrones que caracteriza a la transformación en que interviene este enzima tiene las mismas características que el resto de las transformaciones enzimáticas, parece lógico suponer que el funcionamiento de otros centros activos no debe ser, esencialmente, diferente al de este enzima (aunque serán diferentes las secuencias de polarizaciones y los grupos químicos y los restos de aminoácidos implicados). De aquí se deduce, por otro lado, que la denominada catálisis general ácido-base (la captación y cesión de H^+ por parte de grupos químicos del centro activo del enzima) debe jugar un papel importante y de carácter general en la actividad enzimática (aun cuando, en algunos casos, sea indetectable con los medios utilizados en la actualidad).

Sin duda, el estudio detallado de otros centros activos, además de ayudar a confirmar y concretar esta interpretación, permitirá la comparación entre ellos y, con ello, ayudará también a puntualizar el despliegue filogenético del metabolismo celular.

BIBLIOGRAFÍA.- Cordon, F. La alimentación base de la biología evolucionista I. Ed. Alfaguara, (Madrid), 1977.- Cordon, F. Tratado Evolucionista de Biología, Ed. Aguilar (Madrid), 1990.- Cordon, F. *Las proteínas globulares : su estructura y función supramoleculares*. Mundo Científico, 142 : 40-47 (1994).- Cordon, F. *Las proteínas globulares : su coordinación en el soma celular y su origen desde una evolución molecular*. Mundo Científico, 143 : 144-151 (1994).- Feynman, R.P., Leighton, R.B., Sands, M. Lectures on Physics. Ed. Fondo educativo interamericano, 1971.- Fink, A.L., Geeves, M.A., Crioenzymology : *The study of enzyme catalysis at subzero temperatures*, en "Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanisms" Ed. D.L. Purich, Acad. Press. 1983.- Hanson, K., Rose, I., Accts. Chem. Res. 8:1 1975, citado por Walsh (1977).- Jencks W.P., Catalysis in Chemistry and Enzymology, Mc Graw-Hill, N.Y., 1969.- Jencks W.P., *Binding energy, specificity and anzymic catalysis* en "Advances in Enzymology and Related Areas or Molecular Biology" Vol. 43. Ed. A. Meister, Wiley and Co. N.Y., 1975.- Jencks W.P., *On the attribution and additivity of binding energies*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78/7 : 4046-4050, 1981.- Knowles J. R., *Enzyme catalysis : not different, just better*, Nature 350/6314 : 121-124, 1991.- Laidler K.J., Peterman B.F., *Temperature Effects Enzyme Kinetics* en "Contemporary Enzyme Kinetics and Mechanisms" Ed. D.L. Purich, Acad. Press. 1983.- Moelwyn-Hughes E.A., *Chemistry*. En Encyclopaedia Britannica, Vol. 5 :417., 1969.- Reuben J., *Sustrate anchoring and the catalytic power of enzymes*. Nat. Acad. Sci. 68/3 :563, 1971.- Vennesland B., *Enzymes*, en Encyclopaedia Britannica Vol. 8:620, 1969.- Walsh C., *Enzymatic Reaction Mechanisms*, W.H. Freeman and Company, N.Y. 1977.

Nombre de archivo: función enzimática.doc
Directorio: C:\Documents and Settings\Administrador\Escritorio\Elena Cordón
Plantilla: C:\Documents and Settings\Administrador\Datos de programa\Microsoft\Plantillas\Normal.dot
Título: Introducción
Asunto:
Autor: TXOMIN
Palabras clave:
Comentarios:
Fecha de creación: 21/11/2005 14:03
Cambio número: 14
Guardado el: 22/11/2005 13:12
Guardado por: .
Tiempo de edición: 82 minutos
Impreso el: 22/11/2005 13:12
Última impresión completa
Número de páginas: 17
Número de palabras: 6.723 (aprox.)
Número de caracteres:38.323 (aprox.)